

# Università degli Studi di Napoli “Federico II”



SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA  
Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia

*Dottorato XXVII ciclo*

*“Scienze dell’Alimentazione e della Nutrizione”*

## Oscillazioni del flusso microvascolare in pazienti obesi iperglicemici

**Relatore:**

Ch.mo Prof. Antonio Colantuoni

**Candidata:**

Dott.ssa Teresa Mastantuono

**Coordinatore:**

Ch.mo Prof. Franco Contaldo

**ANNO ACCADEMICO 2013-2014**

*A papà*

# Indice

---

<b>Abstract .....</b>	<b>pag. 6</b>
 <b>INTRODUZIONE .....</b>	 <b>pag. 8</b>
Capitolo I – Struttura dinamica delle arteriole .....	pag. 10
1.1.Tonaca interna: una barriera sanguigna coinvolta nel controllo del tono vascolare.....	pag. 11
1.2.Tonaca media: un regolatore meccanico del diametro vascolare.....	pag. 14
1.3.Tonaca avventizia: più di un supporto strutturale .....	pag. 16
1.4. Regolazione dello stato di perfusione tissutale .....	pag. 17
Capitolo II - <i>Vasomotion e flowmotion</i> .....	pag. 19
2.1. <i>Vasomotion</i> : fenomeni fisiologici alla base della ritmica variazione del diametro delle arteriole.....	pag. 20
2.1.1. Ruolo della conduttanza del cloro.....	pag. 23
2.1.2. Controllo dell'attività di <i>vasomotion</i> .....	pag. 24
2.2. <i>Flowmotion</i> .....	pag. 27
Capitolo III – Flussimetria laser Doppler.....	pag. 31
3.1. Principi di funzionamento della metodica LDPM .....	pag. 32
3.2. Vantaggi e limiti della metodica LDPM .....	pag. 34
3.3. Analisi spettrale del segnale <i>laser Doppler</i> .....	pag. 35
3.4. Oscillazioni del segnale <i>laser Doppler</i> .....	pag. 38
Capitolo IV – Obesità e disfunzione microvascolare.....	pag. 40
4.1. Disfunzione microvascolare nell'obesità .....	pag. 41

4.2. Insulino-resistenza.....	pag. 43
4.2.1. Alterazioni microvascolari nell'insulino-resistenza.....	pag. 44
4.2.2. Effetti dell'insulina sulla <i>vasomotion</i> .....	pag. 45
4.3. Iperglicemia.....	pag. 46

<b>SCOPO .....</b>	<b>pag. 48</b>
--------------------	----------------

<b>MATERIALI E METODI (Capitolo VII) .....</b>	<b>pag. 51</b>
--	----------------

7.1. Gruppi di studio .....	pag. 51
7.2. Valutazione antropometrica .....	pag. 54
7.2.1. Peso corporeo .....	pag. 54
7.2.2. Statura .....	pag. 54
7.2.3. <i>Body mass index</i> (BMI) o indice di massa corporea (IMC).....	pag. 55
7.2.4. Circonferenze corporee .....	pag. 56
7.2.5. Plicometria .....	pag. 58
7.3. Valutazione della composizione corporea .....	pag. 59
7.4. Valutazione del flusso microvascolare.....	pag. 62
7.4.1. Analisi spettrale.....	pag. 64
7.5. Valutazione dell'iperemia reattiva <i>post-ischemica</i> .....	pag. 64
7.6. Analisi statistica .....	pag. 65

<b>RISULTATI.....</b>	<b>pag. 67</b>
-----------------------	----------------

Capitolo VIII - Valutazione dello stato nutrizionale.....	pag. 68
8.1. Gruppo A: Donne normoglicemiche .....	pag. 68
8.2. Gruppo A: Uomini normoglicemici .....	pag. 70
8.3. Gruppo B: Donne iperglicemiche .....	pag. 71
8.4. Gruppo B: Uomini iperglicemici .....	pag. 73

Capitolo IX - Studio del flusso microvascolare .....	pag. 84
9.1. Gruppo A.....	pag. 84
9.2. Gruppo B.....	pag. 86
Capitolo X – Studio dell’iperemia reattiva <i>post</i> -ischemica .....	pag. 96
10.1. Gruppo A.....	pag. 96
10.2. Gruppo B.....	pag. 98
 <b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI .....</b>	<b>pag. 105</b>
 <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>pag. 110</b>

# *Abstract*

---

**Aim:** *The present study was aimed to investigate skin microvascular blood flow oscillations by noninvasively LDPM and to evaluate the effects of insulin resistance and hyperglycemia on skin perfusion in obese subjects. Furthermore, we assessed the effects of hypocaloric diet on skin microvascular blood flow in newly diagnosed hyperglycemic obese patients.*

**Methods:** *Fifty-four normoglycemic (27 females) and fifty-four hyperglycemic (27 females) obese adults were recruited from our Outpatient Clinic and treated with hypocaloric diet for 6 months. Skin microvascular blood flow was recorded by laser Doppler flowmeter and blood flow oscillations were analyzed by wavelet transform. Moreover, reactive hyperemia, due to 2 min brachial artery occlusion, was investigated in fourteen normoglycemic (7 females) and sixteen hyperglycemic (8 females) obese adults.*

**Results:** *Skin microvascular blood flow ( $9.4 \pm 0.3$  vs  $11.8 \pm 0.4$  PU,  $p < 0.01$ ) and total power spectral density (PSD:  $113.2 \pm 10.1$  vs  $176.5 \pm 11.4$  PU<sup>2</sup>/Hz,  $p < 0.01$ ) were lower in the hyperglycemic than normoglycemic people. Among the frequency components of blood flow oscillations, myogenic activity spectral density was lower in hyperglycemic than normoglycemic patients ( $31.0 \pm 0.7$  vs*

*34.9 ± 0.7 %, p<0.01). Moreover, hyperglycemic subjects showed lower hyperemic response to artery occlusion compared to the corresponding one observed in normoglycemic patients. After 6 month hypocaloric diet, blood flow and spectral density significantly increased in hyperglycemic subjects. Myogenic activity-related oscillatory component spectral density was enhanced, while post-occlusive reactive hyperemia significantly improved.*

***Conclusions:*** *In conclusion, insulin resistance- and hyperglycemia-associated microvascular alterations severely affect peripheral resistance and tissue perfusion. Hypocaloric diet appeared to ameliorate arteriolar dilation and blood flow redistribution to tissue.*

# Introduzione

---

Il sistema microvascolare rappresenta quella parte del sistema circolatorio dove avvengono gli scambi tra il sangue e i tessuti. Il microcircolo è formato dai rami finali dell'albero arterioso, che con le arteriole terminali genera i capillari. Questi ultimi, a loro volta, convergendo da diverse direzioni, sboccano nelle venule *post-capillari* e collettrici che formano il versante venoso del sistema microvascolare.

Le arteriole sono costituite da uno strato di cellule endoteliali, che poggiano su cellule muscolari lisce; queste ultime vanno diradandosi fino a diventare gruppi cellulari localizzati all'inizio dei capillari. Le arteriole più piccole (diametro: 7-10  $\mu\text{m}$ ) sono definite arteriole terminali, in quanto danno origine ai capillari ed hanno la funzione di controllare la distribuzione di sangue nei capillari sottostanti.

I capillari sono i vasi più piccoli della microcircolazione (diametro: 4-6  $\mu\text{m}$ ). Sono costituiti da uno strato di cellule endoteliali, circondate dalla membrana basale e, a volte, dai periciti.

Le venule più piccole (diametro: 15-25  $\mu\text{m}$ ), che si formano dalla confluenza dei capillari e per questo anche definite venule *post-capillari*, non

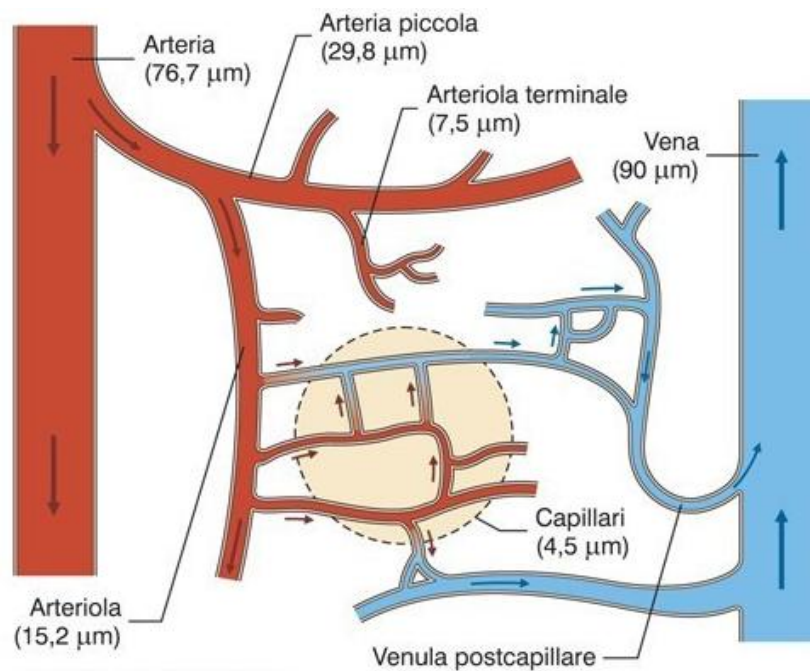


hanno cellule muscolari organizzate in più strati nella loro parete e pertanto permettono gli scambi tra sangue e interstizio. Le venule collettrici sono l'ultima porzione del microcircolo e sono dotate di proprietà contrattile per la presenza di cellule muscolari lisce, che permettono di controllare il flusso in uscita [1].

# Capitolo I

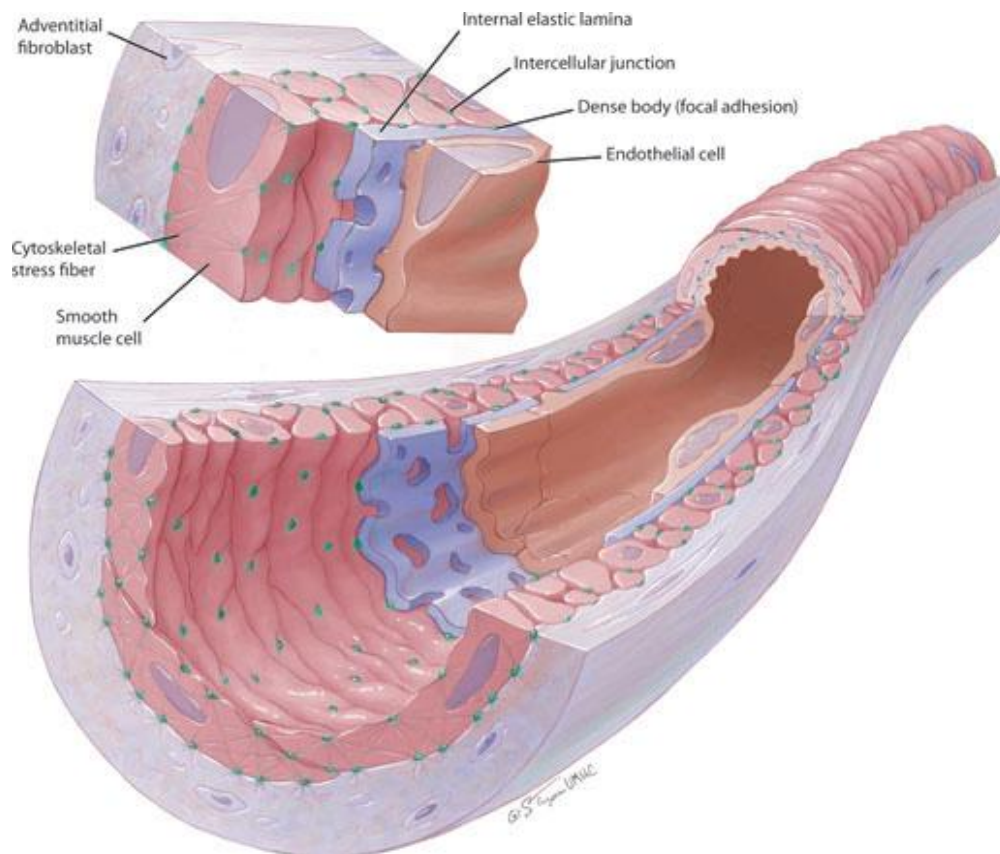
## Struttura dinamica delle arteriole

Le arteriole rappresentano i vasi sanguigni del versante arterioso del sistema circolatorio che danno origine ai capillari e, grazie alla loro capacità di contrarsi e rilassarsi, rappresentano il sito principale di resistenza al flusso sanguigno. Pertanto, l'attività delle arteriole contribuisce al controllo della pressione sanguigna arteriosa e della perfusione tissutale (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** *Network microvascolare.*

La parete arteriolare risulta costituita da elementi cellulari ed extracellulari, che formano tre distinti strati o tonache: intima, media e avventizia (Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Rappresentazione schematica delle arteriole di resistenza.

### **1.1. Tonaca intima: una barriera sanguigna coinvolta nel controllo del tono vascolare**

La tonaca intima rappresenta la porzione più interna, a contatto con il flusso ematico. Nelle arteriole di resistenza essa è formata da un singolo strato di cellule endoteliali che poggiano su una membrana basale. Dal punto di vista

funzionale, le cellule endoteliali partecipano al controllo del tono vasale attraverso la produzione e il rilascio di sostanze vasoattive, che esplicano la loro azione a livello delle sottostanti cellule muscolari della tonaca media. Le proprietà funzionali delle cellule endoteliali sono in parte correlate con la loro struttura. Evidenze sperimentali, infatti, hanno dimostrato che la deformazione endoteliale, causata dal flusso sanguigno, pressione o vasocostrizione, innesca una via di segnalazione intracellulare che determina la sintesi e il rilascio di fattori vasoattivi in grado di regolare la contrattilità delle cellule muscolari lisce e, conseguentemente, il diametro vascolare [2]. Inoltre, è stato evidenziato che la distruzione di specifiche componenti del citoscheletro può compromettere la funzione delle cellule endoteliali [3-7], suggerendo che la struttura cellulare giochi un ruolo importante nella capacità di percepire e trasdurre le forze meccaniche per produrre composti vasoattivi.

Le cellule endoteliali sono disposte in maniera longitudinale rispetto alla direzione del flusso. Esse presentano uno spessore complessivo di 0.2-0.5  $\mu\text{m}$  con un leggero rigonfiamento a livello del nucleo [8]. Nelle arteriole nutritive, le cellule endoteliali presentano una lunghezza approssimativamente di 100  $\mu\text{m}$  ed una larghezza di circa 10  $\mu\text{m}$  [9]. Questo rapporto di 10:1 si riduce progressivamente man mano che si riduce il diametro delle arteriole. Filamenti di F-actina costituiscono le cosiddette fibre da stress, le quali sono ancorate alla membrana plasmatica ed attraversano longitudinalmente l'intera cellula [9, 10]. Le forze tangenziali (o di “*shear*”) inducono sia la formazione delle fibre da stress

sia la stabilizzazione dei microtubuli, permettendo la polarizzazione delle cellule endoteliali e la redistribuzione del centro organizzatore dei microtubuli a valle del nucleo [11]. Pertanto, le cellule endoteliali modificano la loro architettura intracellulare in risposta alle forze meccaniche e il rimodellamento del citoscheletro modula la funzione endoteliale, che risponde alle forze meccaniche rilasciando fattori vasoattivi [4-7, 12-16].

Un'ulteriore funzione delle cellule endoteliali, direttamente associata con la loro struttura, è la permeabilità vascolare. Cambiamenti della morfologia della cellula endoteliale, che avvengono in presenza di tossine e/o processi infiammatori, infatti, promuovono alterazioni delle giunzioni cellulari e della struttura citoscheletrica, determinando un aumento della permeabilità microvascolare. In realtà, questo fenomeno si verifica principalmente a livello delle venule *post-capillari* e collettrici [17, 18].

La membrana basale presenta uno spessore approssimativamente di 0.1  $\mu\text{m}$  ed è composta principalmente da collagene di tipo IV, laminina e proteoglicani contenenti eparan-solfato [19, 20]. Altri componenti della membrana basale sono rappresentati dal collagene di tipo I, II e V, e dalla fibronectina [21]. La funzione principale di questa membrana è fornire un ancoraggio per l'endotelio. Tuttavia, durante il danno endoteliale, la sua esposizione ai componenti del sangue ed alle cellule muscolari lisce vasali fornisce segnali per l'ancoraggio e la migrazione delle cellule attraverso la parete vasale [22].

## 1.2. Tonaca media: un regolatore meccanico del diametro vascolare

La tonaca media è costituita da una lamina elastica interna e da uno o più strati concentrici di cellule muscolari lisce. Nelle arteriole di resistenza rappresenta lo strato più sviluppato.

La lamina elastica interna ha uno spessore approssimativamente di  $0.3\ \mu\text{m}$  ed è formata soprattutto da molecole di elastina resistenti alla degradazione. L'elevato contenuto in elastina favorisce il ritorno elastico della parete dei vasi al diametro originale dopo l'arrivo dell'onda sfigmica [8, 19, 23]. Questa caratteristica è evidente soprattutto nelle arterie di conduzione, mentre meno nelle arteriole in cui la pressione pulsatoria ha un ruolo minore. Al microscopio elettronico a scansione la superficie della lamina elastica interna delle arteriole di resistenza appare come uno strato solido contenente piccole *fenestrae*, che consentono il contatto diretto tra le cellule muscolari lisce e quelle endoteliali [24]. Tuttavia, non tutte le *fenestrae* presentano giunzioni mio-endoteliali [25]. È stato dimostrato che le dimensioni e il numero di queste *fenestrae* cambia in risposta a stimoli fisiologici e patologici. Per esempio, l'incremento del flusso sanguigno cronico comporta il loro ingrandimento [26], mentre l'ipertensione è associata alla loro riduzione in densità e dimensioni [24, 25].

Il più abbondante componente della tonaca media delle arteriole è senza dubbio il muscolo liscio. La funzione primaria delle cellule muscolari lisce di

questo strato è regolare il diametro vascolare attraverso meccanismi di contrazione e rilasciamento. Le cellule muscolari lisce, infatti, sono disposte perpendicolarmente all'asse longitudinale del vaso in modo da circondarlo. Esse sono cellule fusiformi con una lunghezza media approssimativamente di 100  $\mu\text{m}$  [27, 28]. Nelle arteriole nutritive, la larghezza media lungo l'asse trasversale del vaso aumenta progressivamente man mano che il vaso si costringe; mentre la larghezza lungo l'asse longitudinale del vaso è approssimativamente 4  $\mu\text{m}$  e non cambia con la vasocostrizione o la vasodilatazione [29]. Il citoscheletro della cellula muscolare vasale, infatti, è disposto in maniera tale da determinare una riduzione o un incremento dello spessore della cellula, in accordo con i cambiamenti del tono vascolare, senza alterare la lunghezza del vaso [19].

Le connessioni intercellulari tra le cellule muscolari lisce non sono continue e si presentano in forma di semplice apposizione, interdigitazioni, giunzioni intermedie e giunzioni comunicanti. I contatti intercellulari coinvolgono differenti molecole di adesione cellulare come integrine, caderine e connesine [30, 31].

Un'importante caratteristica delle cellule muscolari lisce, associata con il loro ruolo nel controllo del diametro vascolare, è la loro abilità a rilevare e rispondere alle forze meccaniche attraverso un processo di mecano-trasduzione. Ciascuna cellula muscolare liscia è circondata da una membrana basale contenente collagene di tipo IV, fibronectina e alcune fibre di collagene. In aggiunta, piccole fibre elastiche avvolgono le singole cellule muscolari lisce [19,

23, 32]. È stata proposta una forte associazione tra le strutture della matrice extracellulare e le cellule, che risulta importante per la trasduzione delle forze meccaniche durante la risposta cellulare; in particolare, è stato ipotizzato che la matrice extracellulare partecipi al trasferimento dello stress alle cellule muscolari lisce all'interno della parete vascolare [33].

### **1.3. Tonaca avventizia: più di un supporto strutturale**

La tonaca avventizia è formata da alcuni fibroblasti immersi nella matrice extracellulare, costituita principalmente da fibre collagene orientate lungo l'asse longitudinale del vaso. Al contrario delle cellule muscolari lisce della tonaca media, i fibroblasti della tonaca avventizia non sono circondati da una membrana basale [19, 34]. Sono, inoltre, presenti terminazioni nervose non mieliniche, poste ad una distanza approssimativamente di 5  $\mu\text{m}$  dallo strato più esterno del muscolo liscio [19, 35].

In passato, si riteneva che il ruolo dell'avventizia nella funzione vascolare fosse prettamente di tipo strutturale e di supporto per l'ancoraggio delle terminazioni nervose. Tuttavia, recentemente, è stato rivalutato il ruolo dei fibroblasti dell'avventizia nel controllo vascolare. In particolare, essi sono stati associati alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) in grado sia di modulare l'attività delle cellule muscolari lisce della tonaca media sia di partecipare all'innescio del *remodelling* vascolare. Inoltre, i



fibroblasti della tonaca avventizia giocano un ruolo importante nella riparazione vascolare [36, 37, 38].

#### **1.4. Regolazione dello stato di perfusione tissutale**

La perfusione tissutale è regolata dal numero di capillari che vengono irrorati dal sangue proveniente dalle arteriole terminali. In condizioni fisiologiche, l'apporto ematico agli organi varia secondo le esigenze funzionali e metaboliche delle cellule. Per esempio, nel tessuto muscolare scheletrico, la perfusione può aumentare durante l'attività fisica fino a 20 volte rispetto a quella basale.

I meccanismi che consentono di incrementare il flusso ematico in un organo sono rappresentati dalla variazione del diametro arteriolare e dall'aumento del flusso ematico a livello dei capillari.

Krogh ha ipotizzato che l'aumento del flusso capillare sia dovuto al reclutamento di nuovi capillari, precedentemente non perfusi, che vengono irrorati secondo le esigenze metaboliche del tessuto muscolare scheletrico. Secondo questa ipotesi, un sistema di sfinteri pre-capillari sarebbe in grado di ridurre il numero dei capillari perfusi. Dunque, la maggiore perfusione di un organo risulta correlata con l'incremento del numero dei capillari perfusi rispetto alle condizioni basali.

Tuttavia, recenti studi hanno dimostrato che nel muscolo scheletrico di molti animali da laboratorio non esistono sfinteri pre-capillari e che la struttura

delle arteriole terminali, che danno origine ai capillari, è tale che esse fungono da regolatrici della perfusione capillare. Il muscolo liscio è, infatti, dotato di un'attività ritmica di contrazione e rilasciamento, che è stata definita *vasomotion*. Il flusso nei capillari dipende dallo stato di attività del muscolo liscio arteriolare, che durante la contrazione di tutta la muscolatura determina la vasocostrizione delle arteriole, con riduzione o arresto del flusso in tutti i capillari che originano dall'arteriola progenitrice. Al contrario, durante la fase di rilasciamento muscolare, si ha la vasodilatazione con perfusione di tutti i capillari che nascono dall'arteriola progenitrice. Pertanto, lo stato di perfusione di un organo è dovuto alla dilatazione delle arteriole terminali, che perfondono tutti i capillari ai quali danno origine: maggiore è la dilatazione, maggiore sarà la perfusione dell'organo. Le variazioni del diametro delle arteriole sono, a loro volta, dovute all'attività del muscolo liscio vascolare che risponde a stimolazioni di natura pressoria; nervosa, per attivazione del sistema nervoso autonomo; ormonale, dovuta a sostanze circolanti nel sangue; metabolica locale; endoteliale; dipendente dal flusso [1].

## Capitolo II

### *Vasomotion e flowmotion*

La *vasomotion* è caratterizzata *in vivo* dalla variazione ritmica del diametro dei vasi [39, 43]. Queste variazioni del diametro del lume vasale modificano il flusso sanguigno determinandone fluttuazioni ritmiche, definite *flowmotion* [44]. Pertanto, la *flowmotion* può essere descritta come un fenomeno ritmico di variazione del flusso ematico microvascolare.

La *vasomotion* è stata descritta per la prima volta da Jones nel 1852 sulla base di studi effettuati sulla circolazione dell'ala di pipistrello [45]. Successivamente, lo sviluppo di metodi quantitativi per lo studio del flusso nei piccoli vasi ha consentito di evidenziare che, in molti casi, la velocità del flusso microvascolare ha un andamento oscillatorio [46]. Più recentemente, l'oscillazione ritmica del diametro dei vasi è stata confermata mediante studi di video-microscopia, condotti su preparati sperimentali; nell'uomo sono stati, invece, studiati i capillari a livello della zona periungueale delle dita delle mani [47, 48].

L'introduzione della metodica laser Doppler ha permesso di evidenziare in maniera definitiva l'andamento oscillatorio tempo-dipendente del flusso

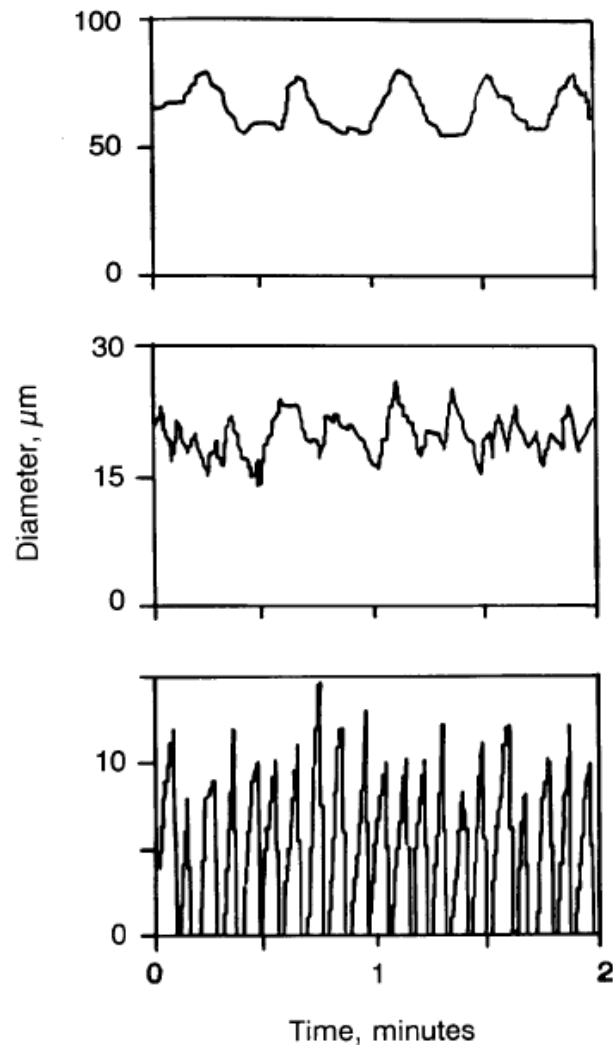
microvascolare cutaneo nell'uomo in zone come la fronte, l'avambraccio e il dorso del piede [49].

## **2.1. Vasomotion: fenomeni fisiologici alla basa della ritmica variazione del diametro delle arteriole**

La *vasomotion* può essere osservata *in vivo* attraverso una metodica di microscopia intravitale [50]; mentre la *flowmotion* può essere valutata mediante la metodica di *Laser Doppler Perfusion Monitoring* (LDPM) o, in alternativa, con altre tecniche come la misurazione della tensione di ossigeno o della pressione sanguigna locale [51-57].

La *vasomotion* è determinata dall'oscillazione del tono delle cellule muscolari dei vasi, infatti, rappresenta una caratteristica soprattutto dei vasi provvisti di miocellule in particolare dei vasi arteriolari. Colantuoni et al. hanno dimostrato, nel tessuto sottocutaneo e nel muscolo cutaneo massimo di criceto, che l'attività di *vasomotion* è fortemente dipendente dalle dimensioni delle arteriole. In particolare, le arteriole di dimensioni maggiori, con un diametro di 50-100  $\mu\text{m}$ , presentano contrazioni e rilasciamenti del muscolo liscio periferico ad una frequenza di 2-3 cicli per minuto (cpm) e le oscillazioni raggiungono un'ampiezza del 10-20 % del diametro medio. Questa attività diventa progressivamente più veloce e di maggiore ampiezza al diminuire del diametro del vaso (Figura 2.1). Nelle arteriole terminali (diametro:  $< 15 \mu\text{m}$ ), infatti, la

frequenza è di 6-12 cpm e l'ampiezza dell'oscillazione può raggiungere il 100 % del diametro medio, determinando ritmicamente l'apertura e la chiusura di questi vasi [47, 58].



**Figura 2.1.** *Vasomotion* registrata nelle arteriole del muscolo sottocutaneo di criceto. Il pannello in basso mostra l'attività di *vasomotion* nelle arteriole terminali, le quali presentano un *pattern* regolare di attività. Al contrario, il pannello in alto mostra l'attività di *vasomotion* nelle arteriole con diametro maggiore. Il pannello intermedio, invece, mostra un *pattern* misto di attività con non può essere definito *vasomotion* e, probabilmente, è dovuta da eventi originanti da *pacemaker* distali.

La *vasomotion* è un fenomeno locale che origina a livello delle biforcazioni delle arteriole, dove sono state individuate cellule muscolari lisce con attività simil-*pacemaker*, in grado di depolarizzarsi ritmicamente e generare un'onda di contrazione e rilasciamento, che si propaga lungo tutto il vaso [58, 59]. In particolare, Peng et al. hanno dimostrato nel mesentere di ratto che il rilascio intermittente di calcio da parte del reticolo sarcoplasmatico, il quale si verifica inizialmente in maniera asincrona all'interno delle cellule muscolari lisce, attiva una corrente depolarizzante. Questa corrente si diffonde a tutte le cellule muscolari mediante *gap junction* e, quando raggiunge un valore soglia sufficiente, provoca la depolarizzazione simultanea di tutte le cellule muscolari lisce. In tal modo, si verifica l'ingresso sincrono di calcio attraverso canali del calcio voltaggio-dipendenti in grado di stimolare un ulteriore rilascio di calcio da parte dei reticoli sarcoplasmatici in maniera sincrona, determinando la contrazione delle cellule muscolari lisce. È stato, inoltre, evidenziato che l'ossido nitrico (*Nitric Oxide*, NO) di derivazione endoteliale e il cGMP hanno un ruolo permissivo sulla sincronizzazione delle cellule muscolari lisce [60, 61].

Studi effettuati da Colantuoni et al. hanno permesso di differenziare nel dettaglio l'attività di *vasomotion* nelle differenti arteriole del muscolo cutaneo massimo di criceto. In particolare, è stato dimostrato che le arteriole del microcircolo del muscolo scheletrico originano da arteriole ad arcata (*arcading*), anastomosi artero-arteriose, che hanno un diametro intorno ai 50  $\mu\text{m}$  e danno origine a vasi terminali che si approfondano tra le cellule muscolari striate. Sono

state individuate due tipi di anse terminali arteriolari, che si differenziano per la loro lunghezza: le anse lunghe (lunghezza:  $\sim 1.000 \mu\text{m}$ ) sono costituite da arteriole di ordine 4, 3, 2 e 1 in accordo allo schema centripeto di Strahler [62, 63] e danno origine ad un numero maggiore di 50 capillari; mentre le anse corte (lunghezza:  $\sim 500 \mu\text{m}$ ) presentano alla loro origine un'arteriola di ordine 3, a cui seguono vasi di ordine 2 e 1, e danno origine a circa 25-30 capillari. Questa differenza anatomica in anse lunghe e corte si ripercuote sull'attività di *vasomotion*. Nelle anse lunghe sono, infatti, presenti differenti *pacemaker* lungo il loro decorso, che danno origine ad onde di vasocostrizione e vasodilatazione con frequenza maggiore man mano che si riduce il diametro. Nelle anse corte, invece, sono presenti cellule *pacemaker* solo a livello dell'arteriola madre di ordine 3, che dominano tutte le altre arteriole del *branching* terminale e tutti i capillari sono perfusi in rapporto alla vasomotilità di questa arteriola [64].

### **2.1.1. Ruolo della conduttanza del cloro**

Aalkajer et al. hanno dimostrato nel mesentere di ratto il ruolo critico della conduttanza del cloro attivata da calcio nella depolarizzazione calcio-dipendente delle cellule muscolari lisce [65-67]. In particolare, essi hanno individuato due tipi di correnti attivate da calcio: la prima esibisce le caratteristiche classiche dei canali del cloro calcio-dipendenti; mentre l'altra presenta proprietà biofisiche uniche e il cGMP risulta necessario per la sua attivazione [65, 67, 68, 69]. Gli autori hanno ipotizzato che il calcio è in grado di attivare il secondo tipo di

corrente del cloro a livello della membrana cellulare, determinandone la depolarizzazione [65-67]. Il ruolo importante di questa conduttanza nella generazione della *vasomotion* è stato dimostrato mediante interventi farmacologici e la sostituzione del cloro con un anione impermeabile. In questo modo, infatti, le oscillazioni del potenziale di membrana e la sincronizzazione dell'ingresso di calcio sono risultate abolite così come l'attività di *vasomotion* delle piccole arterie nel muscolo del mesentere di ratto [70].

### **2.1.2. Controllo dell'attività di *vasomotion***

La *vasomotion* è, quindi, determinata principalmente dall'attività miogena intrinseca delle cellule muscolari lisce della parete vasale, ma può essere influenzata da differenti fattori di tipo sia periferico sia sistemico. I primi comprendono le attività neurogena ed endoteliale; mentre i secondi sono costituiti dall'attività respiratoria e quella cardiaca. Questi fattori agiscono sulle miocellule delle arteriole, inducendone la contrazione o il rilasciamento.

#### ***Attività miogena intrinseca***

Il muscolo liscio vascolare ha la capacità intrinseca di rispondere a svariate stimolazioni, in modo che il flusso del sangue rimanga relativamente costante.

La distensione di un vaso, dovuta ad un aumento della pressione del sangue, costituisce uno stimolo fondamentale per la contrazione delle cellule muscolari lisce delle pareti arteriolari. Sulla base dell'osservazione che le contrazioni miogeniche nei vasi di resistenza dipendono dalla concentrazione del



calcio, è stata formulata l'ipotesi che la risposta miogena sia modulata da canali del calcio sensibili allo stiramento.

La risposta miogena è stata studiata da Bayliss all'inizio del 1900 e ha dato luogo ad una sterminata produzione scientifica. Le cellule muscolari, che rispondono allo stimolo pressorio, sono anche in grado di contrarsi in maniera autonoma generando la serie di contrazioni e rilasciamenti che caratterizzano la *vasomotion*.

Le cellule muscolari delle arteriole sono dotate di recettori in grado di rispondere a stimolazioni di natura ormonale. In particolare, il loro rilasciamento è indotto da adrenalina, peptide vasoattivo intestinale (*vasoactive intestinal peptide*, VIP), sostanza P, peptide connesso al gene della calcitonina (*calcitonin gene-related peptide*, CGRP) e il peptide natriuretico atriale (*atrial natriuretic peptide*, ANP); mentre la loro contrazione è determinata da angiotensina II, vasopressina e neuropeptide Y (NPY).

Le arteriole possono rispondere anche agli stimoli metabolici che si generano nei tessuti. Man mano che aumenta il metabolismo tissutale, infatti, si accumulano prodotti catabolici, che possono determinare vasodilatazione. La riduzione della pressione dell'O<sub>2</sub> produce vasodilatazione nella maggioranza dei distretti vascolari; fa eccezione il circolo polmonare, dove la riduzione della pressione di O<sub>2</sub> si accompagna a vasocostrizione. Al contrario, l'aumento della pressione di O<sub>2</sub> comporta vasocostrizione. Nelle condizioni di ridotto apporto di O<sub>2</sub> rispetto alle richieste funzionali dei tessuti, si producono molte sostanze

vasoattive, come gli ioni idrogeno, il potassio e il fosfato, la  $\text{CO}_2$ , l'ATP e l'AMP, il lattato. L'aumento della pressione parziale di  $\text{CO}_2$ , così come l'aumento di ioni idrogeno insieme al lattato, causa vasodilatazione [1].

### ***Attività neurogena***

Il sistema nervoso simpatico è il principale responsabile del controllo della muscolatura liscia vascolare. L'attività del controllo nervoso è coordinata e integrata dai centri bulbo-pontini, tra i quali ricordiamo il centro vasomotore. Il sistema nervoso simpatico innerva le arteriole più piccole, fino a quelle terminali, e le venule muscolari.

Le cellule muscolari dei vasi sono, quindi, sollecitate ed indotte alla contrazione o al rilasciamento a seconda dei segnali provenienti dal sistema nervoso autonomo [71, 72].

### ***Attività endoteliale***

Le variazioni di flusso ematico nelle arteriole sono in grado di indurre risposte endoteliali, capaci di regolare il tono vascolare. Le forze tangenziali, che agiscono sulle cellule endoteliali (stress di parete o *shear stress*), promuovono la sintesi e la liberazione di mediatori vasoattivi, come il monossido di azoto (NO), prostaglandine, trombossani e endoteline. In particolare, la liberazione di NO e  $\text{PGI}_2$  induce vasodilatazione, mentre quella di trombossani ed endoteline determina vasocostrizione [1].

### ***Attività respiratoria***

La respirazione svolge un ruolo fondamentale nella circolazione: con l'inspirazione, infatti, è esercitata sul sangue una pressione che lo richiama, attraverso il circolo venoso, dalla periferia del corpo verso il cuore. In particolare, il ritorno venoso al cuore è facilitato dalla depressione intratoracica e dall'aumento della pressione nella cavità addominale. Il sangue, pertanto, viene spinto verso l'atrio di destra per la differente pressione che si determina [73].

### ***Attività cardiaca***

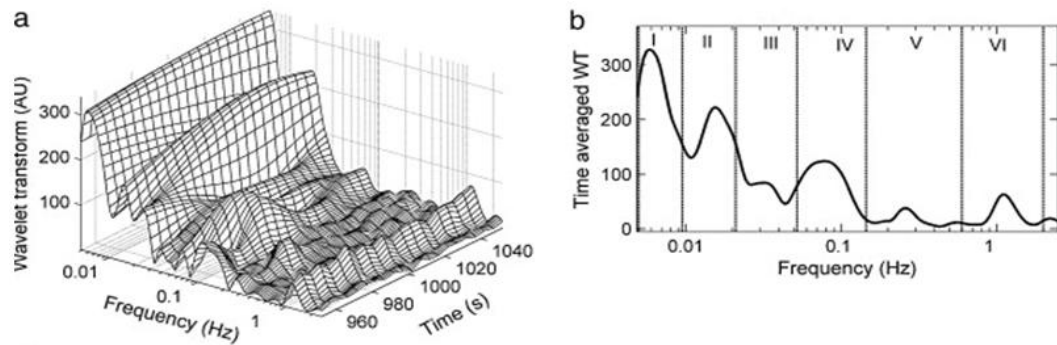
Il cuore ha la funzione di generare una pressione sufficiente a spingere il sangue verso tutti i distretti corporei, vincendo la resistenza che viene opposta dalle pareti vascolari durante il percorso.

L'immissione del sangue sottopressione dal ventricolo sinistro nell'aorta determina una dilatazione della parete dell'aorta. Alla dilatazione segue il ritorno elastico della parete, che esercita un effetto compressivo sul sangue in essa contenuto. La dilatazione dell'aorta e il suo ritorno elastico determinano un'onda di dilatazione e costrizione, che è trasmessa per tutta la sua lunghezza e per tutti i rami che ne derivano fino alle arteriole terminali [1].

## ***2.2. Flowmotion***

La variazione ritmica del diametro dei vasi determina, dunque, un andamento oscillatorio del flusso. Questo fenomeno, chiamato *flowmotion*, è

sincrono con l'attività delle arteriole terminali e si propaga fino ai capillari, che non sono in grado di contrarsi e rilassarsi.



**Figura 2.2.** Analisi spettrale delle componenti in frequenza della *flowmotion*.

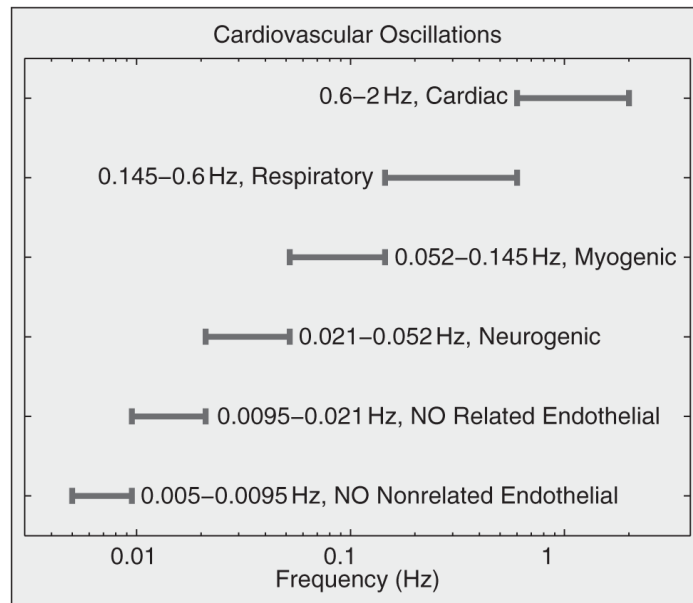
La registrazione del flusso ematico nel microcircolo cutaneo, ottenuto mediante tecnica di LDPM, ha permesso di definire caratteristici tracciati con variazioni che sono dipendenti dal flusso. L'analisi delle oscillazioni del flusso con metodi di spettro di potenza ha permesso di definire gli intervalli di frequenza caratteristici della *flowmotion* compresi tra 0.005 e 2.0 Hz (Figura 2.2). È stato dimostrato che ciascuna delle oscillazioni, contenute in questi intervalli di frequenza, è correlata a specifiche attività fisiologiche in grado di influenzare la microcircolazione. In particolare, Stefanovska et al. hanno individuato sei intervalli di frequenza:

- le oscillazioni del microcircolo, legate all'attività endoteliale, presentano due intervalli di frequenza a seconda che siano o meno dipendenti da NO, per cui si distingue un'attività endoteliale NO-dipendente, che ha una frequenza compresa tra 0.0095 e 0.21 Hz e un'attività endoteliale NO-

indipendente, che ha una frequenza compresa tra 0.005 e 0.0095 Hz. Queste sono le più lente attività ritmiche riconosciute nella *flowmotion* e sono state identificate utilizzando inibitori delle NOS endoteliale e monitorandone gli effetti [75];

- le oscillazioni, legate all'attività neurogena, hanno una frequenza compresa tra 0.021 e 0.052 Hz [74];
- le oscillazioni, legate all'attività miogena intrinseca, hanno una frequenza compresa tra 0.052 e 0.145 Hz [74];
- le oscillazioni, legate all'attività respiratoria, sono debolmente presenti nel segnale ed hanno una frequenza compresa tra 0.145 e 0.6 Hz; la corrispondenza con la frequenza respiratoria è stata verificata misurando simultaneamente le variazioni volumetriche polmonari del soggetto [71];
- le oscillazioni del flusso microvascolare, legate all'attività cardiaca, hanno una frequenza compresa tra 0.6 e 2.0 Hz; questa corrispondenza è stata verificata tramite acquisizione simultanea del segnale elettrocardiografico [74].

Gli intervalli di frequenza correlati alle attività cardiaca e respiratoria sono considerate componenti ad alta frequenza, mentre quelli correlati alle attività miogena intrinseca, neurogena ed endoteliale sono definite componenti a bassa frequenza (Figura 2.3).



**Figura 2.3.** Attività correlate con le oscillazioni comprese tra 0.005-2.0 Hz (Stefanovska et al., 2007).

## Capitolo III

# Flussimetria laser Doppler

Tra le differenti metodiche disponibili per la valutazione del microcircolo, negli ultimi anni ha assunto particolare interesse la flussimetria *laser Doppler*, una metodica semplice, a basso costo e non invasiva, che consente di monitorare lo stato di perfusione cutanea.

La flussimetria *laser Doppler* comprende due metodiche: *laser Doppler perfusion monitoring* (LDPM) e *laser Doppler perfusion imaging* (LDPI). Entrambe le tecniche si basano sull'effetto Doppler, descritto per la prima volta dal fisico austriaco Johan Christian Doppler [76]. Nel 1972, Riva et al. hanno per primi riportato misurazioni del flusso microvascolare effettuate mediante l'effetto Doppler [77]. Successivamente, nel 1975, Stern ha proposto di misurare lo stato di perfusione tissutale, anziché il flusso a livello del singolo vaso, mediante metodiche di flussimetria *laser Doppler* [78]. Questi lavori sono stati, poi, seguiti da numerosi studi condotti al fine di migliorare la tecnica e le misurazioni [79-83].

La metodica LDPM è impiegata nella diagnostica emodinamica per la sua maneggevolezza, non invasività e possibilità di studiare vasi con diametro inferiore a 50  $\mu\text{m}$ . Lo stato di perfusione cutanea è studiato utilizzando una sonda applicata sulla cute; in particolare, questa metodica permette di rilevare il

movimento degli elementi corpuscolati del sangue a livello del microcircolo del plesso superficiale, raggiungendo arteriole, venule, e capillari aventi una sezione trasversale di 0.002-0.008 mm<sup>2</sup> e localizzati alla profondità fino ad 1 mm.

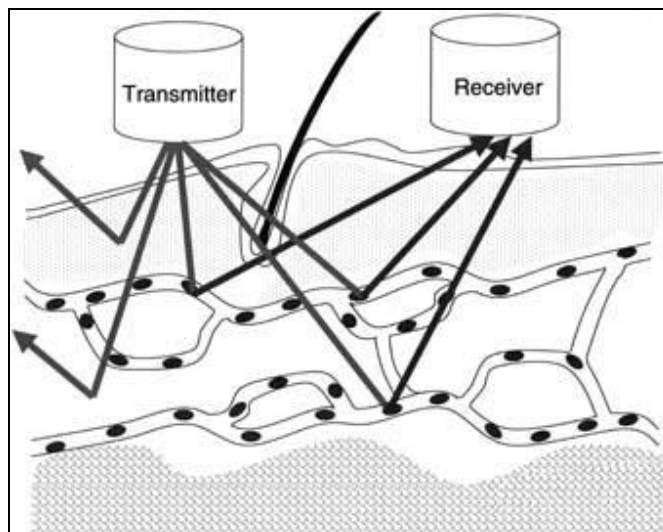
La metodica LDPI, a differenza della precedente, non prevede alcun contatto tra la sorgente laser e il tessuto in esame, bensì una distanza tra apparecchio e tessuto di 15-50 cm; l'elaborazione dei dati genera una mappa bidimensionale colorata, che rappresenta la distribuzione della perfusione ematica.

Le applicazioni cliniche della flussimetria *laser Doppler* sono molteplici: microangiopatia diabetica, malattie vascolari periferiche, fenomeno di Raynaud's, applicazioni farmacologiche, danno termico, chirurgia plastica, malattie cutanee, ecc [84, 85].

### **3.1. Principi di funzionamento della metodica LDPM**

Il flussimetro LDPM emette un raggio di luce monocromatica a bassa energia, che è trasportato da una sonda a fibre ottiche alla porzione di tessuto in esame. La luce è diffusamente riflessa ed è in parte assorbita dal volume di tessuto illuminato. Il fascio di luce, colpendo le cellule ematiche in movimento, subisce una variazione della lunghezza d'onda, detto effetto Doppler (*Doppler shift*), mentre la porzione di fascio che colpisce le strutture statiche non subisce alcuna variazione. La frequenza e l'ampiezza dell'effetto doppler sono in diretta relazione col numero e con la velocità delle emazie, indipendentemente dalla direzione del movimento (Figura 3.1).





**Figura 3.1.** Sonda del flussimetro ed effetto *Doppler*.

La sonda di misurazione contiene anche due fibre ottiche che trasportano la parte del raggio luminoso riflesso ai fotorivelatori, dove è convertito in segnale elettronico. La luce riflessa è composta da lunghezze d'onda differenti e variate o meno per effetto Doppler; solo quelle che hanno subito l'effetto Doppler sono captate dai sensori; pertanto, il segnale di fondo è soppresso. L'apparecchio, in definitiva, rivela un segnale correlato solo con il movimento delle emazie, che viene indicato come flusso ed è definito come il prodotto tra il numero di emazie in movimento in un determinato volume e la loro velocità media.

La misurazione del flusso con questa metodica deve essere eseguita in condizioni ambientali e posturali standardizzate. La sonda deve essere posizionata sulla cute senza compressione, previa detersione, mediante un supporto biadesivo, poiché anche minime pressioni possono alterare i valori di lettura.

Il segnale che se ne ricava è espresso in unità di perfusione arbitrarie (*perfusion units*, PU) e assume nel tempo un andamento tipicamente oscillatorio. Le oscillazioni del segnale corrispondono alla *flowmotion*: la loro entità e la loro frequenza dipendono dal singolo soggetto/paziente e rispecchiano le condizioni locali di perfusione cutanea [84, 85].

### **3.2. Vantaggi e limiti della metodica LDPM**

La metodica LDPM è sufficientemente sensibile ed in grado di rilevare anomalie nella microcircolazione periferica. Ulteriori vantaggi consistono, come già detto precedentemente, nella sua semplicità di utilizzo e nella possibilità di effettuare registrazioni *in vivo* in maniera continua, non invasiva e in tempo reale [84, 85].

Uno svantaggio nell'utilizzo della tecnica LDPM è, però, la mancanza di una misurazione dello zero assoluto (assenza di flusso) dello strumento. Infatti, quando il flusso sanguigno è annullato, sperimentalmente o da escissione chirurgica, spesso lo strumento rileva ugualmente il movimento dei globuli rossi. In passato, la causa principale di tale fenomeno è stata attribuita al moto browniano delle macromolecole presenti nel compartimento interstiziale.

Dal momento che non è possibile associare una quantità fisica assoluta alle misure ottenute, esse risultano di natura esclusivamente relativa; pertanto, per confrontare i risultati tra strumenti e misurazioni diverse risulta necessario applicare una calibrazione standardizzata. Altra condizione necessaria per

comparare i risultati tra misurazioni diverse, ma non sempre realizzabile, è studiare tessuti con le stesse proprietà.

È anche necessario verificare determinate condizioni, quali la permanenza della lunghezza d'onda della sorgente luminosa e della configurazione della sonda. Un ulteriore problema, relativo all'acquisizione del segnale, consiste nel fatto che la sonda è estremamente sensibile ai movimenti della zona sulla quale è fissata. Infatti, si possono generare artefatti se il soggetto sul quale si sta effettuando la misura si muove. In questo caso, al segnale verranno sommati contributi, dovuti al movimento, che non corrispondono a caratteristiche del microcircolo, ma che rappresentano degli artefatti. Essi sono facilmente riconoscibili se il movimento è breve e veloce, poiché si manifestano come un picco che termina dopo pochissimi secondi ed ha un'ampiezza chiaramente distinta dal resto del segnale. Se, invece, il movimento è lento, il suo contributo al segnale può essere confuso con i contributi dovuti al microcircolo, fornendo così risultati fuorvianti. Risulta, infine, difficoltoso testare la validità di una misurazione, perché non esiste ancora un *gold standard* per lo studio della velocità del flusso ematico [86].

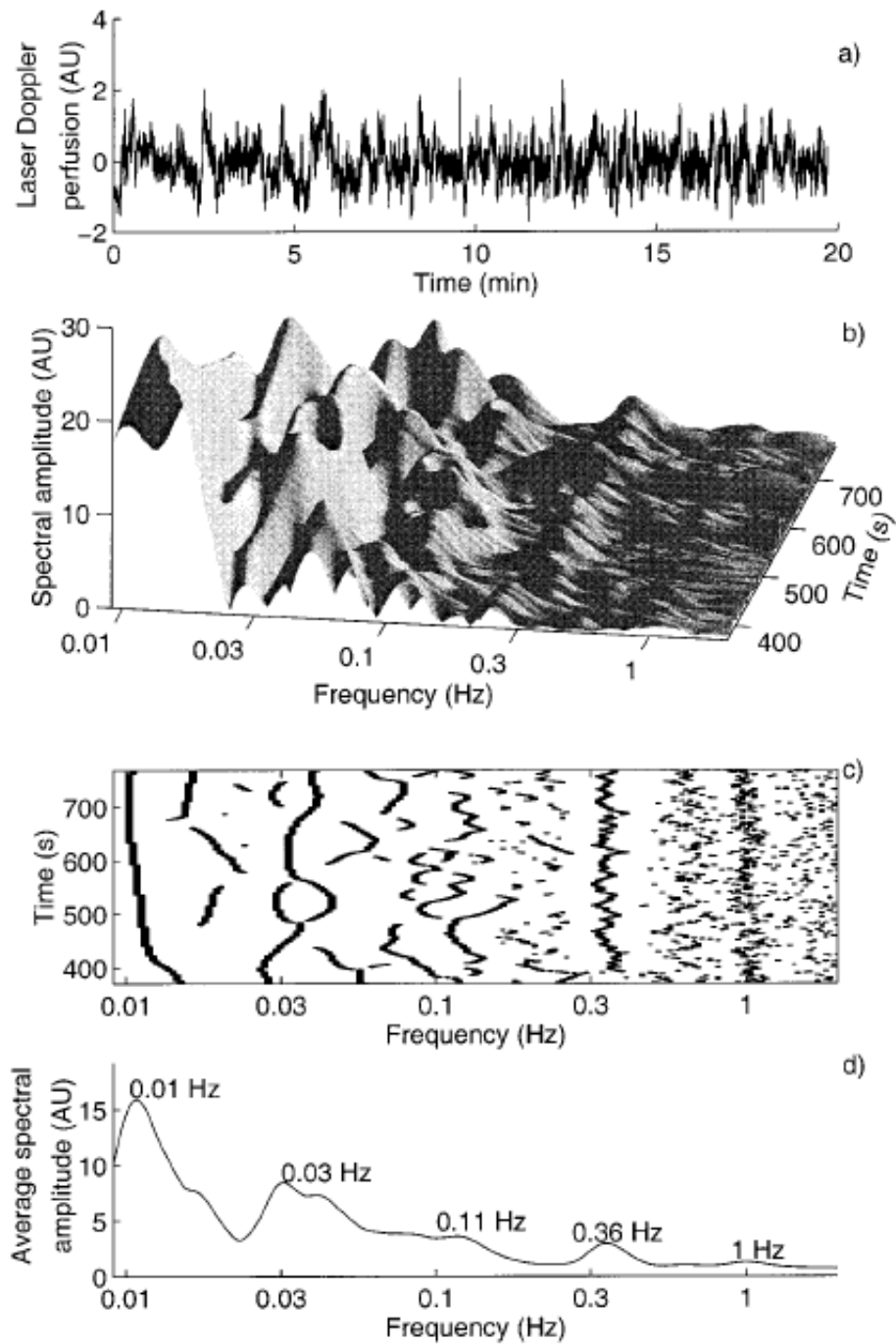
### **3.3. Analisi spettrale del segnale *laser Doppler***

E' possibile studiare le oscillazioni che caratterizzano il segnale *laser Doppler* mediante un algoritmo che utilizza la trasformata di *Wavelet*.

La trasformata di *Wavelet*, proposta da Morlet nel 1983, è un metodo scala-indipendente comprendente una finestra di lunghezza regolabile. Essa permette l'elaborazione di segnali non stazionari, cioè con caratteristiche variabili nel tempo, migliorando la risoluzione in frequenza. In particolare, le basse frequenze sono analizzate usando una finestra più ampia, mentre per le frequenze più alte si usa una finestra più stretta.

Nel dettaglio, l'algoritmo di analisi *Wavelet* prevede l'utilizzo di una finestra, definita *mother Wavelet*, sulla quale vengono applicate operazioni di traslazione e cambiamento di scala in modo da ottenere una famiglia di finestre *Wavelet*. La caratteristica fondamentale della *mother Wavelet* è quella di avere un andamento oscillante e una lunghezza limitata: partendo da 0, l'ampiezza dell'oscillazione aumenta fino a raggiungere un valore massimo per poi decrementare fino ad arrivare a 0.

Sono state proposte numerose forme per la *mother Wavelet* in base all'obiettivo dell'analisi. Il criterio con la quale viene scelta una *mother Wavelet* è la somiglianza con la forma d'onda che si vuole analizzare. Una volta scelta la *mother Wavelet*, quindi, *Wavelet* più lunghe e più corte sono realizzate attraverso il suo allungamento o accorciamento nel tempo. Nel caso dell'analisi del segnale di perfusione cutanea, si utilizza la Morlet *mother Wavelet*, una funzione Gaussiana modulata attraverso un'onda sinusoidale con una corretta localizzazione nei domini di tempo e frequenza [75].



**Figura 3.2.** Il segnale LDPM, espresso in unità arbitrarie di perfusione, in cui i valori di perfusione sono normalizzati rispetto allo zero (AU) (a); la trasformata di *Wavelet* (b); i valori massimi di ampiezza locale (c) e spettro medio (d) del segnale LDPM (Stefanovska et al., 1999).

### 3.4. Oscillazioni del segnale *laser Doppler*

Numerosi studi sono stati condotti nell'uomo al fine di analizzare le oscillazioni del flusso microvascolare cutaneo, registrate mediante metodica LDPM [87-90]. In particolare, come sottolineato precedentemente, Stefanovska et al. hanno studiato le oscillazioni, che caratterizzano il segnale *laser Doppler*, mediante analisi spettrale con trasformata di *Wavelet*. Essi hanno dimostrato che le oscillazioni del flusso microvascolare, presenti nell'intervallo di frequenza 0.005-2.0 Hz, sono correlate a differenti fattori, che agiscono a livello del microcircolo modulando l'apporto ematico ai tessuti. In particolare, sono stati individuati sei intervalli compresi tra 0.005-2.0 Hz: 0.005-0.0095 Hz, 0.0095-0.21 Hz, 0.021-0.052 Hz, 0.052-0.145 Hz, 0.145- 0.6 Hz e 0.6- 2.0 Hz. I primi quattro intervalli a più bassa frequenza sono stati correlati con le attività che agiscono direttamente sul microcircolo:

- gli intervalli compresi tra 0.005-0.0095 e 0.0095-0.21 Hz sono stati correlati con l'attività delle cellule endoteliali NO-indipendente e – dipendente;
- l'intervallo compreso tra 0.021-0.052 Hz è stato correlato con l'attività di scarica del sistema nervoso simpatico;
- l'intervallo compreso tra 0.021-0.052 Hz è stato correlato con l'attività delle cellule muscolari lisce della parete vasale.

Gli ultimi due intervalli a più alta frequenza sono stati, invece, correlati ad attività sistemiche in grado di influenzare il flusso microvascolare; in particolare, gli intervalli compresi tra 0.145-0.6 e 0.6-2.0 Hz sono stati correlati, rispettivamente, all'attività respiratoria ed a quella cardiaca [71, 74, 75].

## Capitolo IV

### Obesità e disfunzione microvascolare

L'obesità è una condizione patologica che identifica un eccesso di tessuto adiposo. Essa è generalmente la risultante della combinazione di fattori genetici ed un inadeguato stile di vita, caratterizzato da una nutrizione inappropriata e un'insufficiente attività fisica. Nella stragrande maggioranza dei casi l'obesità rappresenta una componente importante della sindrome metabolica, una costellazione di fattori di rischio per diabete di tipo II (o mellito) e malattie cardiovascolari (*cardio-vascular disease*, CVD), che comprende l'aumento dei livelli plasmatici di trigliceridi, ridotti livelli di colesterolo legato alle lipoproteine a bassa densità (colesterolo-HDL), ipertensione arteriosa ed insulino-resistenza con ridotta tolleranza ai carboidrati [91-92]. Una caratteristica costante dei pazienti con sindrome metabolica è l'insulino-resistenza, una condizione clinica che consiste nella ridotta sensibilità o responsività dei tessuti periferici, quali muscolo scheletrico, tessuto adiposo e fegato, all'azione metabolica dell'insulina [93]. È stato ampiamente dimostrato che la condizione di insulino-resistenza deriva dalla continua produzione da parte del tessuto adiposo, ed in particolare del grasso viscerale, di numerosi prodotti ormonali (adipochine) e/o citochine proinfiammatorie, che riducono l'azione periferica dell'insulina [93, 94].



#### **4.1. Disfunzione microvascolare nell'obesità**

Una condizione di disfunzione microvascolare si instaura quando è presenta almeno una delle seguenti alterazioni:

- ridotta vasodilazione in risposta alla somministrazione di sostanze vasodilatatrici (es. acetilcolina);
- riduzione della funzione vasodilatatrice delle arteriole di resistenza e del reclutamento capillare in risposta all'iperemia reattiva;
- incremento della reattività vasocostrittrice;
- ridotto reclutamento capillare mediato da insulina.

La presenza di almeno di uno di questi fattori porta alla cosiddetta disfunzione microvascolare, una condizione in cui le diverse componenti della parete microvascolare non sono più in grado di rispondere fisiologicamente ad una variazione dell'omeostasi vascolare [95].

La misurazione della risposta microvascolare è frequentemente effettuata a livello della cute, poiché la cute rappresenta un organo facilmente accessibile su cui è possibile applicare acetilcolina, sodio nitroprussiato (SNP) o insulina mediante iontoforesi e, quindi, misurare le variazioni dello stato di perfusione mediante la metodica LDPM.

È stato dimostrato che l'obesità, l'ipertensione e l'insulino-resistenza sono caratterizzate da disfunzione microvascolare [96-99], che si sviluppa sia a livello

delle arteriole di resistenza sia a livello del letto microvascolare, in maniera progressiva insieme all'incremento del tessuto adiposo [100-101]. In presenza di stimoli vasodilatatori, è stata osservata nei pazienti obesi un'alterazione della vasodilatazione endotelio-dipendente ed una ridotta densità capillare, che appare essere inversamente proporzionale all'adiposità viscerale ed al tessuto adiposo sottocutaneo del tronco [100-103].

Nell'ipertensione, il meccanismo che controlla il tono vasomotore risulta alterato, determinando un incremento della vasocostrizione o una riduzione della risposta vasodilatatoria a vari stimoli, compresa l'insulina [93, 104, 105]. Inoltre, sono state evidenziate alterazioni anatomiche nella struttura delle arteriole di resistenza, come ad esempio un incremento del rapporto parete-lume vasale. Infine, sono stati individuati anche cambiamenti a livello del *network* microvascolare, che comportano una riduzione del numero di arteriole o capillari, definita rarefazione vascolare, all'interno del letto vascolare di vari tessuti (come muscolo e pelle) [93, 104, 106]. Analoghe alterazioni nella funzione e nella struttura microvascolare sono state associate all'insulino-resistenza. Nei soggetti obesi non-diabetici, così come in quelli non-diabetici sovrappeso o ipertesi, la vasodilatazione endotelio-dipendente e il reclutamento capillare durante l'iperemia reattiva sono inversamente correlati alla sensibilità all'insulina [101, 103, 106]. Persino nei soggetti sani, normotesi e non obesi, è stata evidenziata una relazione diretta tra la sensibilità all'insulina e la funzione microvascolare [107].

La disfunzione microvascolare, caratterizzata dall'alterazione sia delle arteriole di resistenza sia del letto microvascolare, può danneggiare non solo la funzione circolatoria periferica nella pelle e nel muscolo, ma anche quella coronarica, retinica e renale [93, 108, 109]. Pertanto, un'alterazione nello stato di perfusione tissutale comporta un danno d'organo e complicazioni che coinvolgono molti letti vascolari, determinando retinopatia, *stroke* lacunare, microalbuminuria e infarto cardiaco. Inoltre, la disfunzione microvascolare appare essere un predittore di prognosi o di incremento dell'incidenza di eventi cardiovascolari [93, 108]. Complessivamente, il *Framingham risk score* risulta inversamente correlato con il reclutamento capillare [110], la densità capillare cutanea massima [111] e la riserva del flusso coronarico [112].

## **4.2. Insulino-resistenza**

Recenti evidenze hanno dimostrato che il rilascio di insulina a livello dell'interstizio del muscolo scheletrico rappresenta lo *step* limitante nell'*uptake* di glucosio, stimolato dall'insulina; inoltre, risulta più lento nei soggetti obesi insulino-resistenti rispetto ai soggetti normali. È interessante osservare che l'insulina agisce anche a livello vascolare a differenti livelli in modo da regolare potenzialmente il proprio rilascio nell'interstizio del muscolo, determinando: rilasciamento delle arterie/arteriole di resistenza al fine di incrementare il flusso sanguigno totale; rilasciamento delle arteriole terminali per incrementare la superficie di scambio microvascolare, che risulta perfusa all'interno del muscolo

scheletrico (reclutamento capillare); cambiamenti dell'attività di *vasomotion* delle arteriole di resistenza [94, 113, 114].

#### **4.2.3. Alterazioni microvascolari nell'insulino-resistenza**

L'insulino-resistenza nel muscolo scheletrico è caratterizzata dalla ridotta capacità dell'insulina di stimolare la via di segnalazione fosfatidilinositolo 3-chinasi (*Phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K) - dipendente. Tuttavia, i recettori dell'insulina e la segnalazione mediata dall'insulina non interessano esclusivamente il muscolo scheletrico, ma sono localizzati anche a livello delle cellule vascolari. In particolare, il *target* specifico dell'insulina è rappresentato dalle cellule endoteliali a livello delle quali stimola il rilascio di NO attraverso un meccanismo PI3K-dipendente, che coinvolge la fosforilazione di eNOS via Akt, determinando vasodilatazione. In alternativa, nelle cellule endoteliali l'insulina attiva la via della chinasi attivata da mitogeni (*Mitogen-activated protein kinases*, MAPK), che stimola la formazione del vasocostrittore endotelina-1 (ET-1) attraverso la via ERK1/2 [115, 116]. Nei soggetti sani, la segnalazione vasodilatatoria risulta predominante; ma se il recettore dell'insulina, che stimola eNOS, è farmacologicamente inibito o *downregolato* dall'insulino-resistenza, la vasodilatazione e la vasocostrizione insulino-mediate appaiono compromesse. In questo modo, l'insulino-resistenza contribuisce allo sviluppo dell'ipertensione e all'alterazione della captazione di glucosio [94, 117, 118].

Nei ratti obesi è stato dimostrato che la via di segnalazione dell'insulina è compromessa in maniera selettiva: l'attivazione insulino-mediata di PI3K, Akt e eNOS è alterata; mentre l'attivazione insulino-mediata di ERK1/2 risulta intatta [119-120]. Recentemente, è stato dimostrato che l'alterazione della via di segnalazione dell'insulina è dovuto alla ridotta espressione di IRS2 e della fosforilazione di eNOS all'interno delle cellule endoteliali [117].

Nei soggetti sani, l'insulina stimola sia ET-1 sia NO a livello delle arteriole di resistenza dell'avambraccio [121]. Inoltre, i soggetti obesi e ipertesi mostrano una vasocostrizione indotta da insulina [122] così come una vasocostrizione insulino-mediata, che si accompagna ad un incremento del tono vasocostrittore ET-1-dipendente con una riduzione del tono vasodilatatore NO-dipendente a livello delle arteriole di resistenza [123].

#### **4.2.2. Effetti dell'insulina sulla *vasomotion***

Studi sperimentali e clinici sono stati condotti per valutare l'effetto dell'insulina sull'attività di *vasomotion* mediante metodica LDPM; in particolare, sono stati posizionati *probe* a livello del muscolo della zampa di ratti o della gamba di pazienti, entrambi sottoposti a clamp iperinsulinemico. È stato dimostrato che l'iperinsulinemia sistemica comporta un'alterazione della *vasomotion* microvascolare, determinando l'incremento delle componenti di frequenza correlate con le attività endoteliale e neurogena nella cute e nel muscolo, e che il contributo di queste attività nella *vasomotion* risulta

compromesso anche nei soggetti obesi con insulino-resistenza [124]. Questi risultati, però, differiscono rispetto a quelli ottenuti mediante somministrazione iontoforetica di insulina; infatti, l'iperinsulinemia locale, indotta attraverso la iontoforesi di insulina, sembra alterare il meccanismo di *vasomotion* incrementando le oscillazioni correlate con l'attività miogena [125]. Allo stesso modo, studi effettuati sul muscolo di ratto hanno evidenziato una ridotta attività di *vasomotion*, che si accompagna ad un incremento della componente di frequenza correlata con l'attività miogena durante l'insulino-resistenza acuta [126].

### **4.3. Iperglicemia**

L'iperglicemia, conseguente ad una condizione di insulino-resistenza, è responsabile soprattutto della disfunzione endoteliale. Numerosi studi suggeriscono che il danno da iperglicemia all'endotelio possa essere secondario a stress ossidativo [127-128]. Le specie reattive dell'ossigeno, infatti, possono modulare la funzione cellulare, i segnali recettoriali e le risposte immuni in condizioni fisiologiche, ma quando presenti in eccesso mediano un progressivo danno endoteliale attraverso la crescita e la migrazione delle cellule muscolari lisce vascolari e delle cellule infiammatorie, l'alterazione della matrice extracellulare, l'apoptosi delle cellule endoteliali, l'attivazione di fattori di trascrizione (NFkB, AP-1), l'espressione di citochine infiammatorie e di molecole di adesione (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina). Recenti evidenze suggeriscono che la maggiore fonte di ROS è la NADPH ossidasi, attivata soprattutto

dall'angiotensina II, dallo *shear stress* e dall'iperglicemia. La mancanza di equilibrio tra la produzione di radicali liberi e la capacità di neutralizzarli da parte dei sistemi antiossidanti determina una condizione di stress ossidativo. I ROS possono alterare il tono vascolare tramite l'aumento della concentrazione di calcio citosolico e soprattutto determinando una minore disponibilità di ossido nitrico, principale mediatore della funzione endoteliale ad azione vasodilatatrice [129].

# Scopo

---

Il diabete di tipo II (o mellito) è un disordine metabolico caratterizzato da insulino-resistenza, che provoca una condizione di iperglicemia cronica con alterazione del metabolismo dei glucidi, dei lipidi e delle proteine. Nel 1997 e nel 2003 l'*Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus* ha stabilito i criteri per la diagnosi di diabete mellito basandosi sui livelli di glicemia a digiuno (*fasting plasma glucose*, FPG):

- FPG  $\geq 126$  (7.0 mmol/L) mg/dL permette di porre diagnosi di diabete;
- FPG compreso tra 110 e 126 mg/dL (6.1-7.0 mmol/L) consente di diagnosticare una condizione di alterata omeostasi del glucosio;
- FPG  $< 110$  mg/dL (6.1 mmol/L) permette di considerare il paziente euglicemico [130].

Il diabete mellito è una malattia cronica che predispone ad un elevato rischio di sviluppare complicanze micro- e macro-vascolari. Esse possono essere causate da differenti tipi di disfunzione vascolare, che vanno dal danno all'endotelio vascolare a cambiamenti nelle proprietà della parete vasale, che determinano l'incremento delle resistenze periferiche e l'alterazione dello stato di



perfusionione cutanea [131-133]. Le complicanze microvascolari comprendono la retinopatia, che rappresenta la maggior causa di cecità tra gli adulti, e la nefropatia, che può condurre ad insufficienza renale cronica e dialisi; mentre quelle macrovascolari includono l'infarto miocardico e l'*ictus* cerebrale. Infatti, le persone affette da diabete di tipo II presentano un rischio più elevato di sviluppare malattie cerebro-cardiovascolari rispetto alla popolazione non diabetica. Nei Paesi industrializzati l'incidenza e la prevalenza di questa patologia sono destinate ad aumentare a causa dell'incremento dell'aspettativa di vita della popolazione e della diffusione di abitudini alimentari non corrette [134]. Pertanto, risulta di estrema importanza diagnosticare precocemente le complicazioni vascolari in modo da prevenirne la loro progressione.

Le alterazioni, indotte dal diabete, nello stato di perfusione cutanea possono essere, dunque, accompagnate da cambiamenti nelle proprietà strutturali della parete dei vasi o nell'attività dei meccanismi regolatori. Da questo punto di vista, risulta di primaria importanza l'introduzione di metodi che consentano di migliorare il monitoraggio delle complicanze microvascolari del diabete e di studiare quei parametri che riflettono i cambiamenti strutturali e funzionali dei vasi.

La metodica LDPM consente di studiare lo stato di perfusione cutanea in maniera non invasiva, utilizzando una sonda applicata sulla cute. Inoltre, l'analisi spettrale del segnale *laser Doppler* permette di studiare le oscillazioni del flusso microvascolare [88, 89]. Stefanovska et al. hanno dimostrato che nell'intervallo di

frequenza 0.005 - 2.0 Hz sono presenti ritmiche oscillazioni, caratterizzate da sei picchi a livello di specifiche frequenze. La posizione di ciascun picco differisce in ogni individuo e cambia nel tempo in uno stesso soggetto; però, in soggetti sani è stato dimostrato che questi picchi sono sempre compresi all'interno dei seguenti intervalli di frequenza (*frequency band*, FB): 0.005-0.0095, 0.0095-0.021, 0.021-0.052, 0.052-0.145, 0.145-0.6 e 0.6-2.0 Hz. E' stato dimostrato che ciascuna delle oscillazioni, contenute in questi intervalli di frequenza, è correlata a specifiche attività fisiologiche in grado di influenzare il microcircolo: i primi quattro intervalli, definiti a bassa frequenza, sono rispettivamente correlati alle attività endoteliali NO-indipendente e -dipendente, all'attività neurogena ed a quella miogena; gli ultimi due intervalli a più alta frequenza sono correlati con l'attività respiratoria e quella cardiaca [75].

Lo scopo del presente progetto di Dottorato di Ricerca è stato quello di studiare le alterazioni precoci causate da una condizione di iperglicemia ed insulino-resistenza a livello del flusso microvascolare. In particolare, è stato studiato il flusso microvascolare cutaneo dell'avambraccio mediante la metodica LDPM sia in condizioni basali sia dopo stimolazione acuta, mediante l'occlusione dell'arteria brachiale, in pazienti obesi con livelli di glicemia inferiori a 110 mg/dL, definiti normoglicemici, ed in pazienti obesi con livelli di glicemia superiori a 110 mg/dL, ossia iperglicemici. Inoltre, nei pazienti iperglicemici è stata valutata l'efficacia di una dieta ipocalorica sulla disfunzione microvascolare.

# Materiali e metodi

---

## 7.1. Gruppi di studio

Sono stati reclutati 108 pazienti con età compresa tra i 55 e 64 anni tra quelli afferenti all'ambulatorio dell'Unità Operativa Complessa (U.O.C.) di Dietoterapia nell'Adulto e nell'Anziano del Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli "Federico II". Essi sono stati suddivisi in due gruppi di studio in base ai valori di glicemia che presentavano alla prima osservazione:

- gruppo normoglicemico A, costituito da 54 pazienti (27 donne) con livelli di glicemia  $< 110$  mg/dL;
- gruppo iperglicemico B, formato da 54 pazienti (27 donne) con livelli di glicemia  $> 110$  mg/dL.

Nello studio sono stati inclusi pazienti di entrambi i sessi con BMI  $> 30$  Kg/m<sup>2</sup>. I criteri di esclusione, invece, sono stati: presenza di patologie concomitanti in grado di influenzare la composizione corporea (neoplasie, osteoporosi conclamata, distrofia muscolare), malattie cardiovascolari e/o microangiopatia. Sono state, inoltre, escluse donne in gravidanza in allattamento e

pazienti in terapia con insulina, farmaci e/o integratori ipoglicemizzanti o interferenti con il flusso microvascolare (vasodilatatori, anticoagulanti e antinfiammatori).

Durante la prima osservazione (tempo  $T_0$ ), i pazienti sono stati sottoposti a visita dietologica specialistica, durante la quale è stata eseguita l'anamnesi fisiologica e patologica prossima e remota. È stata, quindi, condotta un'anamnesi familiare al fine di valutare la presenza di alcune patologie nella famiglia d'origine (principalmente tumori, diabete, dislipidemie e malattie cardiovascolari). È stata, inoltre, delineata la storia del peso del paziente, riportando in cartella le misurazioni passate che il paziente ricordava. Il paziente è stato, poi, sottoposto ad un'indagine alimentare in cui ha descritto il tipo e la quantità di alimenti assunti abitualmente. Infine, nell'ambito della prima visita sono stati effettuati:

- la rilevazione delle misure antropometriche: altezza, peso, *body mass index* (BMI) o indice di massa corporea (IMC), circonferenza vita, circonferenza fianchi, plicometria;
- gli esami strumentali: Biompedenziometria per la determinazione della composizione corporea; flussimetria laser Doppler, per lo studio del flusso microvascolare cutaneo;
- la valutazione degli esami ematochimici: emocromo, quadro proteico, colesterolo totale, HDL e LDL, trigliceridi, glicemia, transaminasi GOT e

GPT,  $\gamma$ -GT, CPK, emoglobina glicata, insulina basale, indice HOMA, fosfatasi alcalina, TSH, FT3 e FT4.

I pazienti sono stati sollecitati a variare le proprie abitudini alimentari e ad attenersi ad un regime dietetico ipocalorico, volto al raggiungimento del peso ottimale nel rispetto del fabbisogno energetico giornaliero e delle linee guida offerte dai LARN: carboidrati: 55-60% del fabbisogno energetico giornaliero (alimenti ricchi in fibre e a basso indice glicemico); proteine (10 -15%); grassi (25- 30%).

Ai pazienti iperglicemici è stato, inoltre, consigliato di:

- preferire alimenti integrali ricchi di fibre come la frutta, la verdura ed i cereali integrali;
- non fare pasti troppo abbondanti, ma suddividere l'apporto calorico giornaliero (specie dei carboidrati) in 5 pasti (3 pasti principali + 2 spuntini) per tenere costante i livelli di glicemia;
- preferire sempre negli spuntini l'associazione degli zuccheri semplici (es: frutta), assorbiti velocemente, con zuccheri complessi (es: 1 fetta biscottata integrale), assorbiti lentamente nel tempo.

Il *Follow up* ha previsto un periodo totale di 6 mesi con controlli mensili per la rivalutazione dello stato nutrizionale e trimestrali per la determinazione dei parametri ematochimici. Il flusso microvascolare cutaneo è stato studiato dopo 3 (tempo T<sub>1</sub>) e 6 (tempo T<sub>2</sub>) mesi di trattamento dietetico.

## **7.2. Valutazione antropometrica**

Il rilevamento delle misure antropometriche è fondamentale nella valutazione dello stato nutrizionale. Si ottengono, infatti, dati quantitativi che consentono sia il paragone dei parametri del paziente con valori standard sia l'osservazione delle variazioni nel medesimo paziente nel tempo. Le misure antropometriche utilizzate per la stima dello stato nutrizionale sono state: peso corporeo, statura, BMI, circonferenze e diametri corporei, e plica tricipitale.

### **7.2.1 Peso corporeo**

La misura del peso corporeo è il primo rilievo essenziale per la valutazione dello stato nutrizionale del paziente. Esso è stato rilevato mediante l'utilizzo di una bilancia a pesi mobili. Per la corretta misurazione del peso corporeo, è necessario che il rilevatore si assicuri che la bilancia sia ben tarata (ossia in perfetto equilibrio con lo zero) e che il paziente salga sulla bilancia senza scarpe, con abiti leggeri o con i soli indumenti intimi, posizionando i piedi al centro della piattaforma ed avendo cura di non poggiare contro nessuna parte della bilancia.

### **7.2.2. Statura**

La statura è indicata come la distanza tra la superficie del tallone, a contatto con il piano di riferimento, ed il punto più alto della testa. Essa è stata determinata utilizzando uno altimetro che si compone di un'asta verticale graduata in mm e cm dal basso verso l'alto e munita di cursore, su cui è inserita un'asta

mobile ad angolo retto. Questa barra mobile è stata appoggiata sulla testa del paziente, esercitando una pressione sufficiente a comprimere i capelli. Per la corretta misurazione della statura del paziente, è necessario che il paziente abbia i piedi scalzi con i talloni uniti, la testa sul piano orizzontale di Frankfort e le braccia pendenti ai lati del tronco con il palmo rivolto verso l'interno.

### 7.2.3. *Body mass index* (BMI) o indice di massa corporea (IMC)

Il BMI è espresso come rapporto tra il peso (Kg) e l'altezza al quadrato ( $m^2$ ) e rappresenta l'indice ponderale più comunemente usato nella pratica clinica per lo *screening* dell'obesità, perché risulta significativamente correlato con il grasso corporeo totale.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) utilizza i seguenti parametri per definire le condizioni nutrizionali di un individuo dalla magrezza fino all'obesità:

<b>CLASSIFICAZIONE BMI (<math>kg/m^2</math>)</b>	
<b>Sottopeso</b>	< 18.5
<b>Normopeso</b>	18.5 - 24.9
<b>Sovrappeso</b>	25.0 - 29.9
<b>Obesità (I classe)</b>	30.0 - 34.9
<b>Obesità (II classe)</b>	35.0 - 39.9
<b>Obesità (III classe)</b>	$\geq 40$

**Tabella 7.1.** Classificazione dello stato nutrizionale dell'adulto in base ai valori di BMI

Si definisce, quindi, in sovrappeso un individuo con BMI compreso tra 25 e 30 Kg/ m<sup>2</sup>, mentre per valori di BMI  $\geq 30$  Kg/m<sup>2</sup> si pone una diagnosi di obesità (Tabella 7.1).

La classificazione di sovrappeso e obesità nell'adulto mediante l'utilizzo del BMI è considerata valida indipendentemente dall'età e dal sesso. I limiti legati all'utilizzo del BMI sono rappresentati dal fatto che non considera la taglia ossea e non è in grado di discriminare se le variazioni di peso sono dovute al tessuto adiposo o al tessuto muscolare. Inoltre, il BMI valuta esclusivamente l'entità del sovrappeso e non permette di differenziare il grasso sottocutaneo da quello viscerale.

#### **7.2.4. Circonferenze corporee**

Sono state determinate le circonferenze di polso, braccio, vita e fianchi mediante l'uso di un metro flessibile ed anelastico. Inoltre, è stato calcolato il rapporto vita/fianchi.

La *circonferenza del polso* è un indicatore della crescita e della taglia corporea, poiché questa regione del corpo è relativamente priva di tessuto adiposo e muscolare. La misurazione è stata effettuata appena sotto i processi stiloidi del radio e dell'ulna del braccio non dominante. È stato chiesto al paziente di flettere il braccio, in modo che il palmo della mano era rivolto verso l'alto ed i muscoli della mano erano rilassati.



La *circonferenza del braccio* destro e sinistro (disteso e flesso) rappresenta un indice delle riserve energetiche dell'organismo e della sua massa proteica. La misurazione è stata effettuata nel punto medio del braccio, localizzato tra il processo dell'acromion della scapola e l'olecrano. È stato chiesto al paziente di rilasciare il braccio, tenendo il gomito steso ed appena sollevato dal tronco con il palmo della mano rivolto verso l'interno. La misurazione è stata ripetuta dopo la flessione di 90° del gomito con il palmo della mano rivolto verso l'alto.

La *circonferenza vita* è un indicatore del tessuto adiposo sottocutaneo addominale. Recenti studi hanno correlato la circonferenza vita con il grasso viscerale e con l'aumento del rischio di malattie cardiovascolari e metaboliche. Per la corretta misurazione della circonferenza vita, è necessario che il paziente sia in posizione eretta, a piedi uniti, con il peso del corpo equamente distribuito sulle gambe ed abbia l'addome rilassato e le braccia pendenti ai lati del corpo. La misurazione è stata effettuata nel punto della circonferenza minima tra il margine costale inferiore e la spina iliaca antero-superiore. I valori normali sono < 102 cm per gli uomini e < 88 cm per le donne.

La *circonferenza fianchi* è un indice di adiposità, muscolarità e struttura ossea della regione dei fianchi. Per la corretta misurazione della circonferenza fianchi, è necessario che il paziente sia in posizione eretta, a piedi uniti, con il peso del corpo equamente distribuito sulle gambe ed abbia l'addome rilassato e le braccia pendenti ai lati del corpo. La misurazione è stata effettuata nel punto della circonferenza massima della circonferenza dei glutei.

Il rapporto tra la circonferenza vita e la circonferenza fianchi (o *waist to hip ratio*, WHR) è stato utilizzato per valutare la distribuzione corporea del tessuto adiposo; fisiologicamente, la distribuzione della massa adiposa nell'uomo e nella donna può presentarsi di tipo: viscerale o androide, tipicamente maschile, si associa ad una maggiore distribuzione di tessuto adiposo nella regione intra-addominale, toracica e dorsale; periferica o ginoide, tipicamente femminile, il grasso è presente soprattutto nel compartimento sottocutaneo, nelle regioni dei glutei e in quelle femorali. I valori di riferimento del WHR sono:  $< 1.0$  nell'uomo e  $> 0.85$  nella donna.

#### **7.2.5. Plicometria**

La plicometria o misurazione delle pliche cutanee (tricipitale, bicipitale, sottoscapolare e soprailiaca) è una metodica di misurazione del grasso corporeo.

Per il nostro studio, è stata misurata la plica tricipitale, un indice dei depositi adiposi sottocutanei della regione posteriore del braccio. Essa è stata misurata utilizzando il plicometro, costituito da una pinza in grado di esercitare una pressione costante di  $10 \text{ g/mm}^2$  e da una scala graduata che misura le distanze tra le punte. La misurazione è stata effettuata sulla superficie posteriore del braccio, sopra il muscolo tricipite, esattamente in corrispondenza del punto indicato per la misurazione della circonferenza del braccio. Le misurazioni sono state effettuate sullo stesso lato, dopo aver evidenziato il punto di repere con una matita dermografica. Con il pollice e l'indice della mano sinistra è stato sollevato

uno strato di cute, circa 1 cm al di sopra del punto di repere, avendo cura di non pizzicare anche il muscolo o prendere un doppio strato di cute. La plica è stata, quindi, sollevata e le estremità del calibro sono state applicate alla cute in modo tale che lo spessore di questa sia misurato su un piano trasversale rispetto all'asse longitudinale della plica. La misurazione è stata ripetuta 3 volte dopo circa 2 sec dal rilascio del calibro sulla plica e, per ogni plica, è stata riportata la media delle 3 misurazioni effettuate. Le misure sono state ripetute quando si discostavano più di 5 mm. Nel caso in cui l'apertura massima del plicometro non è stata sufficiente a rilevare la plica, essa è stata considerata per convenzione  $> 39$  [135].

### **7.3. Valutazione della composizione corporea**

La valutazione della composizione corporea è fondamentale per determinare lo stato fisiologico-nutrizionale del paziente. Nella pratica clinica, è comunemente effettuata mediante l'esame bioimpedenziometrico (*Body Impedance Analysis*, BIA).

La BIA è una metodica veloce e precisa che misura il vettore impedenza ( $Z$ , espresso in Ohm), ovvero la resistenza opposta dal corpo umano al passaggio di una corrente alternata a bassa intensità (400  $\mu A$ ) e ad una frequenza fissa di 50 kHz. In particolare, il passaggio della corrente attraverso i tessuti del corpo può essere ostacolato a seconda del tipo di tessuto che incontra: solo una piccola quantità di corrente passa attraverso il tessuto adiposo e questo si traduce in elevati valori di impedenza corporea; mentre le cellule dei muscoli, che

contengono una percentuale maggiore di acqua, si lasciano attraversare dalla corrente con più facilità, determinando valori di impedenza inferiori.

Il vettore di impedenza si divide in due componenti:

- resistenza ( $R_z$ , espresso in Ohm), è determinata dal passaggio della corrente attraverso l'acqua dell'organismo, quindi il suo valore è inversamente proporzionale all'acqua corporea;
- reattanza ( $X_c$ , espresso in Ohm), è determinata dal passaggio della corrente attraverso le membrane cellulari, le quali fungono da condensatori al passaggio della corrente, quindi il suo valore è proporzionale alla massa cellulare corporea.

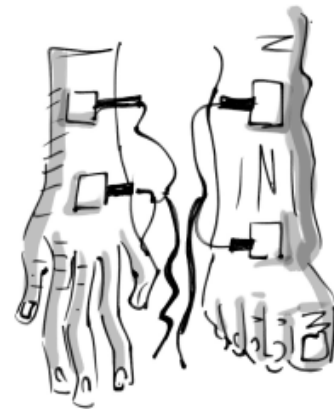
Il rapporto tra resistenza e reattanza è espresso da un'ulteriore misura, detto angolo di fase, con cui è possibile stimare anche la massa cellulare attiva, ossia la componente metabolicamente attiva della massa libera dal grasso. L'angolo di fase può variare tra 0 e 90° : un circuito dotato di sola resistenza e nessuna capacità (per esempio un sistema di fluidi privo di membrane cellulari), avrà un angolo di fase pari a 0°; mentre un circuito che possiede solo capacità e nessuna resistenza (per esempio un insieme di membrane privo di fluidi), avrà un angolo di fase pari a 90°. In un individuo sano l'angolo di fase è compreso tra 4 e 10°; valori più bassi sono associati a bassa reattanza e/o ad alta resistenza e possono significare un'espansione degli spazi extracellulari per ritenzione di liquidi oppure la perdita funzionale delle membrane cellulari per necrosi; valori

più alti sono associati ad alta reattanza e/o bassa resistenza e possono indicare, per esempio stati di disidratazione oppure la presenza di notevoli quantità di membrane cellulari integre.

La misurazione è stata effettuata mediante l'impedenziometro BIA 101 (Akern, Italia) (Figura 7.2). Al paziente, disteso sul lettino e non a contatto con elementi metallici, è stata detersa la cute e sono stati applicati due coppie di elettrodi (tecnica tetrapolare mano-piede) (Figura 7.3):



**Figura 7.2.** Bioimpedenziometro.



**Figura 7.3.** Punti di repere.

- due elettrodi iniettori, che iniettano corrente a bassissima intensità nei seguenti punti di repere: uno sul dorso della mano destra tra la seconda e terza epifisi metacarpale; l'altro sul dorso del piede a livello della seconda epifisi metatarsale;
- due elettrodi sensori che sono rilevatori del voltaggio nei seguenti punti di repere: uno sul polso in posizione intermedia tra i processi stiloidei

dell'ulna e del radio; l'altro sulla caviglia in posizione intermedia tra i malleoli mediali e laterali.

Durante la misurazione, è necessario che il paziente abbia gli arti inferiori divaricati di 45° e quelli superiori abdotti di 30°, in modo da evitare contatti cutanei con il tronco.

La BIA fornisce i valori dell'acqua totale (*Total Body Water*, TBW) e dell'acqua extracellulare (*Extracellular Water*, ECW). Mediante l'utilizzo di opportune equazioni è possibile ottenere anche le misure di acqua intracellulare (*Intracellular Water*, ICW), massa magra (*Fat Free Mass*, FFM), massa grassa (*Fat Mass*, FM), massa muscolare (*Muscle Mass*, MM) e massa cellulare (*Body Cell Mass*, BCM) [136].

#### **7.4. Valutazione del flusso microvascolare**

La registrazione del flusso ematico cutaneo è stata eseguita in un ambulatorio a temperatura costante (22 °C), con variazioni inferiori a 2 °C. Al paziente, disteso sul lettino, è stata detersa la cute ed applicata la sonda del laser Doppler sulla parte interna dell'avambraccio, in una regione in cui non vi sono i vasi sanguigni maggiori. Dopo l'acclimatazione del paziente alle condizioni ambientali e la stabilizzazione del tracciato, la registrazione è stata condotta per 20 minuti. Dal momento che il tracciato laser Doppler è particolarmente sensibile al movimento, è stato chiesto al paziente di rimanere immobile durante tutto il periodo di registrazione.

È stato utilizzato il flussimetro PeriFlux PF 4001 Master (Perimed, Svezia) (Figura 7.4). La sorgente laser consiste in un diodo allo stato solido in grado di emettere luce nel campo dei rossi visibili avente energia di 2 MW e 780 nm di lunghezza d'onda, mentre la sonda è Probe 408 (Perimed, Svezia) con separazione tra le fibre di invio e di ricezione di 0,25 mm. Il flussimetro è stato collegato ad un computer, che analizza l'informazione sullo stato di perfusione cutanea mediante il *software* Perisoft.



**Figura. 7.4.** Flussimetro laser Doppler.

Il flussimetro fornisce in uscita una successione di valori, ognuno dei quali indica l'ampiezza del segnale (in *perfusion unit*, PU) acquisito in un certo istante, in particolare ogni sedicesimo di secondo a seconda del campionamento. Essi sono rappresentati in un sistema di coordinate in cui l'asse delle x rappresenta il tempo, mentre l'asse delle y l'ampiezza del segnale. L'analisi spettrale del segnale laser Doppler è stata eseguita mediante la trasformata di Fourier e quella di *wavelet*.

#### **7.4.1. Analisi spettrale**

L'analisi spettrale del segnale laser Doppler permette di studiare le oscillazioni del flusso microvascolare mediante la trasformata di *Wavelet*, la quale è stata su tutti i 20 minuti di registrazione.

Nell'intervallo di frequenza 0.005-2.0 Hz sono state individuate ritmiche oscillazioni, caratterizzate da sei picchi a livello di specifiche frequenze: 0.005-0.0095, 0.0095-0.021, 0.021-0.052, 0.052-0.145, 0.145-0.6 e 0.6-2.0 Hz. E' stato dimostrato che le oscillazioni, contenute in questi intervalli di frequenza, sono correlate a specifiche attività fisiologiche in grado di influenzare il microcircolo: gli intervalli a bassa frequenza sono rispettivamente correlati alle attività endoteliali NO-indipendente e -dipendente, all'attività neurogena ed a quella miogena; mentre quelli a più alta frequenza sono correlati con l'attività respiratoria e quella cardiaca [75].

È stata calcolata l'ampiezza media di ciascun intervallo di frequenza all'interno dello spettro di potenza totale; questo valore è stato, poi, normalizzato rispetto all'ampiezza media dell'intero spettro di potenza definendo in questo modo gli spettri di potenza relativi.

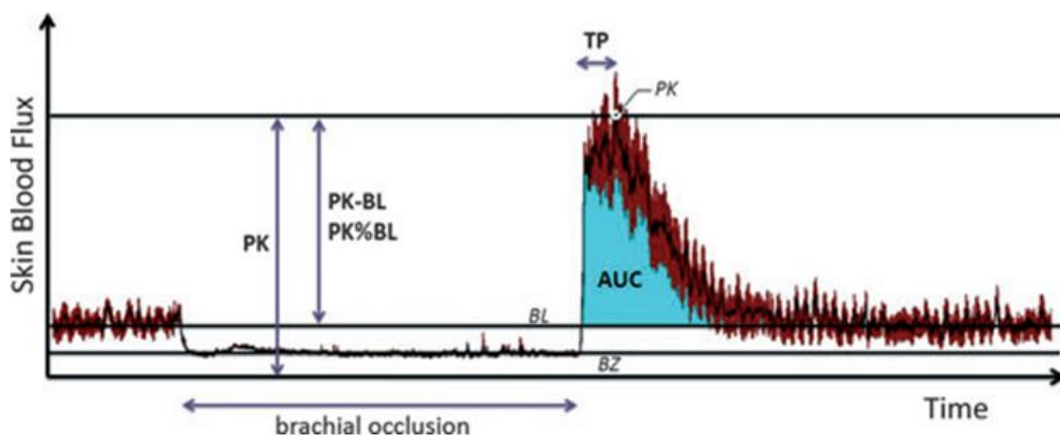
#### **7.5. Valutazione dell'iperemia reattiva *post-ischemica***

Dopo la registrazione del flusso microvascolare in condizioni basali, lo sfigmomanometro è stato posizionato nella parte distale del braccio a livello



dell'arteria brachiale e gonfiato fino a 50 mmHg al di sopra della pressione sistolica del paziente per un periodo totale di 2 minuti. Dopo questo intervallo di tempo, lo sfigmomanometro è stato rapidamente sgonfiato e il flusso microvascolare è stato registrato fino a quando i valori, rilevati dal flussimetro, sono diventati comparabili con quelli basali.

Sono stati misurati i seguenti parametri: l'incremento massimo (espresso in percentuale); il picco massimo (PK), ossia il massimo valore raggiunto durante l'iperemia (espresso in PU); il tempo trascorso per raggiungere il picco massimo, detto tempo al picco (Tp), e la durata della risposta iperemica (entrambi espressi in secondi) [137].



**Figura. 7.5.** Esempio di risposta iperemica *post-occlusiva*.

## 7.6. Analisi statistica

I dati sono stati valutati per la loro distribuzione con il test di Kolmogorov-Smirnov. Per i dati con distribuzione gaussiana, sono stati utilizzati il *t test* di Student, l'ANOVA e il *post-hoc* test di Scheffé. Per i dati con

distribuzione non-gaussiana, sono stati utilizzati il test di Wilcoxon, il test di Mann-Whitney e il test di Kruskal-Wallis. La significatività statistica è stata fissata a  $p < 0.05$ . Tutti i valori sono stati riportati come media  $\pm$  errore standard.

# Risultati

---

I pazienti reclutati per lo studio sono stati seguiti per un periodo di 6 mesi. Alla prima osservazione presso l'ambulatorio dell'Unità Operativa Complessa (U.O.C.) di Dietoterapia nell'Adulto e nell'Anziano del Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli "Federico II", essi sono stati sottoposti a misurazione dei parametri antropometrici ed a esame bioimpedenziometrico. Sono stati, inoltre, valutati gli esami ematochimici, tra cui i livelli ematici di glicemia, emoglobina glicata e insulina basale, ed è stato calcolato l'indice HOMA. È stato studiato, infine, il flusso microvascolare mediante metodica LDPM in condizioni basali. Le stesse valutazioni sono state ripetute dopo 3 e 6 mesi di trattamento dietetico.

In 30 pazienti (15 donne) dei 108 reclutati è stato studiato il flusso microvascolare mediante LDPM sia in condizioni basali sia dopo stimolazione ischemica acuta con l'occlusione dell'arteria brachiale alla prima osservazione, dopo 3 e 6 mesi di trattamento.

## Capitolo VIII

### Valutazione dello stato nutrizionale

Le caratteristiche dei pazienti normoglicemici (gruppo A) ed iperglicemici (gruppo B) sono state riportate, rispettivamente, nelle tabelle 1 e 2. Alla prima osservazione tutti i pazienti, reclutati per lo studio, presentavano obesità centrale ed uno stato nutrizionale alterato. In aggiunta, i pazienti del gruppo B mostravano un quadro di iperglicemia ed insulino-resistenza; è importante osservare che in tutti i pazienti, appartenenti al gruppo B, l'iperglicemia era stata diagnosticata di recente.

#### 8.1. Gruppo A: Donne normoglicemiche

Dopo 3 mesi di regime dietetico ipocalorico le donne, appartenenti al gruppo A, hanno mostrato una significativa riduzione del peso corporeo ( $81.9 \pm 1.9$  vs  $86.3 \pm 1.8$ ,  $p < 0.01$  vs I visita) e del BMI ( $32.9 \pm 0.9$  vs  $34.7 \pm 0.8$ ,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 8.1). Dopo il trattamento dietetico, inoltre, è stata evidenziata una riduzione significativa della circonferenza vita ( $101.8 \pm 2.1$  vs  $105.2 \pm 2.1$  cm,  $p < 0.01$  vs I visita), accompagnata da un'altrettanto significativa riduzione della circonferenza fianchi ( $111.9 \pm 1.6$  vs  $114.3 \pm 1.6$  cm,  $p < 0.01$  vs I visita). È

stata, altresì, osservata una riduzione significativa della plica tricipitale ( $26.3 \pm 1.2$  vs  $28.7 \pm 1.4$  mm,  $p < 0.01$  vs I visita).

La valutazione della composizione corporea, effettuata con l'esame bioimpedenziometrico, ha evidenziato variazioni significative in queste pazienti. In particolare, ha mostrato una significativa riduzione della massa grassa espressa sia in kg ( $34.3 \pm 1.7$  vs  $37.8 \pm 1.6$  Kg,  $p < 0.01$  vs I visita) sia in percentuale ( $41.3 \pm 1.4$  vs  $43.5 \pm 1.2$  %,  $p < 0.01$  vs I visita), accompagnata da un aumento significativo della massa magra percentuale ( $58.7 \pm 1.4$  vs  $56.5 \pm 1.2$  %,  $p < 0.01$  vs I visita). Infine, in queste pazienti i valori di glicemia (Figura 8.3), emoglobina glicata, insulina basale e indice HOMA (Figura 8.5), già all'interno dei *range* di riferimento, sono rimasti costanti come riportato in tabella 8.1.

Dopo 6 mesi di trattamento dietetico è stata osservata un'ulteriore riduzione del peso corporeo ( $78.7 \pm 1.9$  vs  $86.3 \pm 1.8$ ,  $p < 0.01$  vs I visita) e del BMI ( $31.6 \pm 0.9$  vs  $34.7 \pm 0.8$ ,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 8.1), accompagnata da una significativa riduzione dei seguenti parametri antropometrici: circonferenza vita ( $97.7 \pm 1.9$  vs  $105.2 \pm 2.1$  cm,  $p < 0.01$  vs I visita), circonferenza fianchi ( $101.4 \pm 1.6$  vs  $114.3 \pm 1.6$  cm,  $p < 0.01$  vs I visita) e plica tricipale ( $24.2 \pm 1.1$  vs  $28.7 \pm 1.4$  mm,  $p < 0.01$  vs I visita).

Le pazienti, sottoposte ad esame bioimpedenziometrico, hanno evidenziato un'ulteriore riduzione della massa grassa espressa sia in kg ( $31.7 \pm 1.5$  vs  $37.8 \pm 1.6$  Kg,  $p < 0.01$  vs I visita) sia in percentuale ( $39.9 \pm 1.0$  vs  $43.5 \pm 1.2$  %,  $p < 0.01$  vs I visita) ed un ulteriore incremento della massa magra percentuale ( $60.1 \pm 1.0$

vs  $56.5 \pm 1.2$  %,  $p < 0.01$  vs I visita). In queste pazienti, infine, non sono state osservate variazioni significative nei valori di glicemia (Figura 8.3), emoglobina glicata, insulina basale e indice HOMA (Figura 8.5), come riportato in tabella 8.1.

## 8.2. Gruppo A: Uomini normoglicemici

Gli uomini, appartenenti al gruppo A e trattati con dieta ipocalorica, hanno evidenziato una significativa riduzione del peso corporeo ( $93.1 \pm 3.3$  vs  $98.8 \pm 3.7$ ,  $p < 0.01$  vs I visita) e del BMI ( $32.0 \pm 1.1$  vs  $34.0 \pm 1.1$ ,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 8.2) dopo 3 mesi di trattamento. E' stata, inoltre, osservata una riduzione significativa della circonferenza vita ( $108.4 \pm 2.5$  vs  $112.9 \pm 2.5$  cm,  $p < 0.01$  vs I visita), della circonferenza fianchi ( $107.0 \pm 2.7$  vs  $111.6 \pm 2.5$  cm,  $p < 0.01$  vs I visita) e della plica tricipitale ( $22.6 \pm 1.6$  vs  $25.4 \pm 1.5$  mm,  $p < 0.01$  vs I visita).

I pazienti, sottoposti ad esame bioimpedenziometrico, hanno mostrato un decremento della massa grassa espressa sia in kg ( $25.6 \pm 1.7$  vs  $31.5 \pm 0.9$  Kg,  $p < 0.01$  vs I visita) sia in percentuale ( $26.9 \pm 0.9$  vs  $31.4 \pm 0.9$  %,  $p < 0.01$  vs I visita) insieme all'aumento della massa magra percentuale ( $73.1 \pm 0.9$  vs  $68.6 \pm 0.9$  %,  $p < 0.01$  vs I visita). Infine, in questi pazienti i valori di glicemia (Figura 8.4), emoglobina glicata, insulina basale e indice HOMA (Figura 8.6), già all'interno dei *range* di riferimento, sono rimasti costanti come riportato in tabella 8.1.

Dopo 6 mesi di trattamento dietetico gli uomini, appartenenti al gruppo A, hanno mostrato un'ulteriore riduzione del peso corporeo ( $88.1 \pm 2.7$  vs  $98.8 \pm 3.7$ ,

p<0.01 vs I visita) e del BMI ( $30.3 \pm 0.9$  vs  $34.0 \pm 1.1$ , p<0.01 vs I visita) (Figura 8.2) insieme all'ulteriore riduzione dei seguenti parametri antropometrici: circonferenza vita ( $101.4 \pm 1.6$  vs  $112.9 \pm 2.5$  cm, p<0.01 vs I visita), circonferenza fianchi ( $104.8 \pm 2.2$  vs  $111.6 \pm 2.5$  cm, p<0.01 vs I visita) e plica tricipitale ( $20.1 \pm 1.4$  vs  $25.4 \pm 1.5$  mm, p<0.01 vs I visita).

I pazienti, sottoposti ad esame bioimpedenziometrico, hanno mostrato un'ulteriore riduzione della massa grassa espressa sia in kg ( $21.9 \pm 1.5$  vs  $31.5 \pm 0.9$  Kg, p<0.01 vs I visita) sia in percentuale ( $24.4 \pm 1.0$  vs  $31.4 \pm 0.9$  %, p<0.01 vs I visita) ed un ulteriore incremento della massa magra percentuale ( $75.6 \pm 1.0$  vs  $68.6 \pm 0.9$  %, p<0.01 vs I visita). Non sono state, invece, evidenziate variazioni significative nei valori di glicemia (Figura 8.4), emoglobina glicata, insulina basale e indice HOMA (Figura 8.6), come riportato in tabella 8.1.

### **8.3. Gruppo B: Donne iperglicemiche**

Dopo 3 mesi di regime dietetico ipocalorico le donne, appartenenti al gruppo A, hanno evidenziato una significativa riduzione del peso corporeo ( $87.2 \pm 1.4$  vs  $93.0 \pm 3.1$ , p<0.01 vs I visita) e del BMI ( $34.6 \pm 0.7$  vs  $37.1 \pm 0.8$ , p<0.01 vs I visita) (Figura 8.1), che è stata accompagnata da un'altrettanto significativa riduzione della circonferenza vita ( $114.3 \pm 1.5$  vs  $121.3 \pm 1.6$  cm, p<0.01 vs I visita) e della circonferenza fianchi ( $110.3 \pm 1.4$  vs  $114.9 \pm 1.4$  cm, p<0.01 vs I visita). È stata, inoltre, osservata una riduzione significativa della plica tricipitale ( $23.9 \pm 0.7$  vs  $29.2 \pm 1.0$  mm, p<0.01 vs I visita).

Le pazienti hanno mostrato variazioni della composizione corporea, come rivelato dall'esame bioimpedenziometrico. In particolare, è stata osservata una riduzione significativa della massa grassa espressa in kg ( $39.4 \pm 1.7$  vs  $42.9 \pm 2.1$  Kg,  $p < 0.01$  vs I visita) e della massa magra espressa in Kg ( $47.9 \pm 1.4$  vs  $50.1 \pm 1.4$  %,  $p < 0.01$  vs I visita), accompagnata da un incremento significativo della massa magra percentuale ( $55.2 \pm 0.8$  vs  $54.4 \pm 1.1$  %,  $p < 0.01$  vs I visita). Infine, è stato osservato un miglioramento del profilo glucidico, infatti, la dieta ipocalorica ha determinato la significativa riduzione dei valori di glicemia ( $102.2 \pm 1.7$  vs  $121.8 \pm 3.2$  mg/dL,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 8.3), Hb glicata ( $6.0 \pm 0.1$  vs  $7.7 \pm 0.5$  %,  $p < 0.01$  vs I visita), insulina basale ( $11.6 \pm 1.9$  vs  $15.1 \pm 1.5$   $\mu$ U/ml,  $p < 0.01$  vs I visita) ed indice HOMA ( $2.8 \pm 0.3$  vs  $4.5 \pm 0.4$ ,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 8.5), come riportato in tabella 8.2.

Dopo 6 mesi di trattamento dietetico è stata osservata un'ulteriore riduzione del peso corporeo ( $84.6 \pm 2.6$  vs  $93.0 \pm 3.1$ ,  $p < 0.01$  vs I visita) e del BMI ( $35.4 \pm 1.1$  vs  $38.9 \pm 1.0$ ,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 8.1), che è stata accompagnata da una riduzione significativa dei seguenti parametri antropometrici: circonferenza vita ( $103.8 \pm 1.8$  vs  $110.6 \pm 2.1$  cm,  $p < 0.01$  vs I visita), circonferenza fianchi ( $115.2 \pm 2.3$  vs  $120.1 \pm 2.2$  cm,  $p < 0.01$  vs I visita) e plica tricipale ( $28.9 \pm 1.0$  vs  $34.0 \pm 0.8$  mm,  $p < 0.01$  vs I visita).

Le pazienti, sottoposte ad esame bioimpedenziometrico, hanno evidenziato un'ulteriore riduzione della massa grassa espressa in kg ( $37.3 \pm 1.6$  vs  $42.9 \pm 2.1$  Kg,  $p < 0.01$  vs I visita) insieme ad una significativa riduzione della massa grassa



percentuale ( $43.7 \pm 1.1$  vs  $45.6 \pm 1.1$  %,  $p < 0.01$  vs I visita), accompagnata da un ulteriore incremento significativo della massa magra percentuale ( $56.3 \pm 1.1$  vs  $54.4 \pm 1.1$  %,  $p < 0.01$  vs I visita). Infine, è stata osservata un'ulteriore riduzione dei valori glicemia ( $100.1 \pm 1.7$  vs  $121.8 \pm 3.2$  mg/dL,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 8.3), Hb glicata ( $5.4 \pm 0.5$  vs  $7.7 \pm 0.5$  %,  $p < 0.01$  vs I visita), insulina basale ( $9.6 \pm 2.1$  vs  $15.1 \pm 1.5$   $\mu$ U/ml,  $p < 0.01$  vs I visita) ed indice HOMA ( $2.2 \pm 0.3$  vs  $4.5 \pm 0.4$ ,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 8.5), come riportato in tabella 8.2.

#### **8.4. Gruppo B: Uomini iperglicemici**

Gli uomini, appartenenti al gruppo B e trattati con dieta ipocalorica, hanno mostrato una significativa riduzione del peso corporeo ( $101.1 \pm 2.2$  vs  $108.5 \pm 2.7$ ,  $p < 0.01$  vs I visita) e del BMI ( $32.0 \pm 1.1$  vs  $34.0 \pm 1.1$ ,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 8.2) dopo 3 mesi di trattamento. È stata, inoltre, evidenziata una riduzione significativa della circonferenza vita ( $114.3 \pm 1.5$  vs  $121.3 \pm 1.6$  cm,  $p < 0.01$  vs I visita) e della circonferenza fianchi ( $110.3 \pm 1.4$  vs  $114.9 \pm 1.4$  cm,  $p < 0.01$  vs I visita), accompagnata dalla riduzione significativa della plica tricipitale ( $23.9 \pm 0.7$  vs  $29.2 \pm 1.0$  mm,  $p < 0.01$  vs I visita).

I pazienti, sottoposti ad esame bioimpedenziometrico, hanno mostrato una significativa riduzione della massa grassa espressa sia in kg ( $30.9 \pm 0.9$  vs  $34.8 \pm 1.8$  Kg,  $p < 0.01$  vs I visita) sia in percentuale ( $30.4 \pm 0.4$  vs  $31.6 \pm 1.0$  %,  $p < 0.01$  vs I visita) e della massa magra espressa in Kg ( $70.0 \pm 1.4$  vs  $73.6 \pm 1.2$  %,  $p < 0.01$  vs I visita). Infine, i pazienti, appartenenti al gruppo B, hanno mostrato un

miglioramento del profilo glucidico, infatti, la dieta ipocalorica ha determinato la significativa riduzione dei livelli di glicemia ( $115.0 \pm 3.5$  vs  $139.5 \pm 6.8$  mg/dL,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 8.4), emoglobina glicata ( $5.9 \pm 0.1$  vs  $7.1 \pm 0.8$  %,  $p < 0.01$  vs I visita), insulina basale ( $11.5 \pm 1.8$  vs  $15.1 \pm 1.2$   $\mu$ U/ml,  $p < 0.01$  vs I visita) ed indice HOMA ( $3.1 \pm 0.3$  vs  $5.2 \pm 0.4$ ,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 8.6), come riportato in tabella 8.2.

Dopo 6 mesi di trattamento dietetico gli uomini, appartenenti al gruppo B, hanno mostrato un'ulteriore riduzione del peso corporeo ( $97.2 \pm 2.2$  vs  $108.5 \pm 2.7$ ,  $p < 0.01$  vs I visita) e del BMI ( $33.3 \pm 0.7$  vs  $37.1 \pm 0.8$ ,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 8.2) insieme all'ulteriore riduzione dei seguenti parametri antropometrici: circonferenza vita ( $110.3 \pm 1.6$  vs  $121.3 \pm 1.6$  cm,  $p < 0.01$  vs I visita), circonferenza fianchi ( $109.6 \pm 1.6$  vs  $114.9 \pm 1.4$  cm,  $p < 0.01$  vs I visita) e plica tricipitale ( $22.5 \pm 0.8$  vs  $29.2 \pm 1.0$  mm,  $p < 0.01$  vs I visita).

I pazienti, sottoposti ad esame bioimpedenziometrico, hanno mostrato un'ulteriore riduzione della massa grassa espressa sia in kg ( $28.2 \pm 0.9$  vs  $34.8 \pm 1.8$  Kg,  $p < 0.01$  vs I visita) sia in percentuale ( $28.9 \pm 0.5$  vs  $31.6 \pm 1.0$  %,  $p < 0.01$  vs I visita) e della massa magra espressa in Kg ( $69.0 \pm 1.5$  vs  $73.6 \pm 1.2$  %,  $p < 0.01$  vs I visita), che è stata accompagnata da un significativo incremento nella massa percentuale ( $71.1 \pm 0.5$  vs  $68.4 \pm 1.0$  %,  $p < 0.01$  vs I visita). Infine, è stata osservata un'ulteriore riduzione dei valori di glicemia ( $104.4 \pm 2.2$  vs  $139.5 \pm 6.8$  mg/dL,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 8.4), emoglobina glicata ( $5.7 \pm 0.1$  vs  $7.1 \pm 0.8$  %,  $p < 0.01$  vs I visita), insulina basale ( $10.7 \pm 1.6$  vs  $15.1 \pm 1.2$   $\mu$ U/ml,  $p < 0.01$  vs I

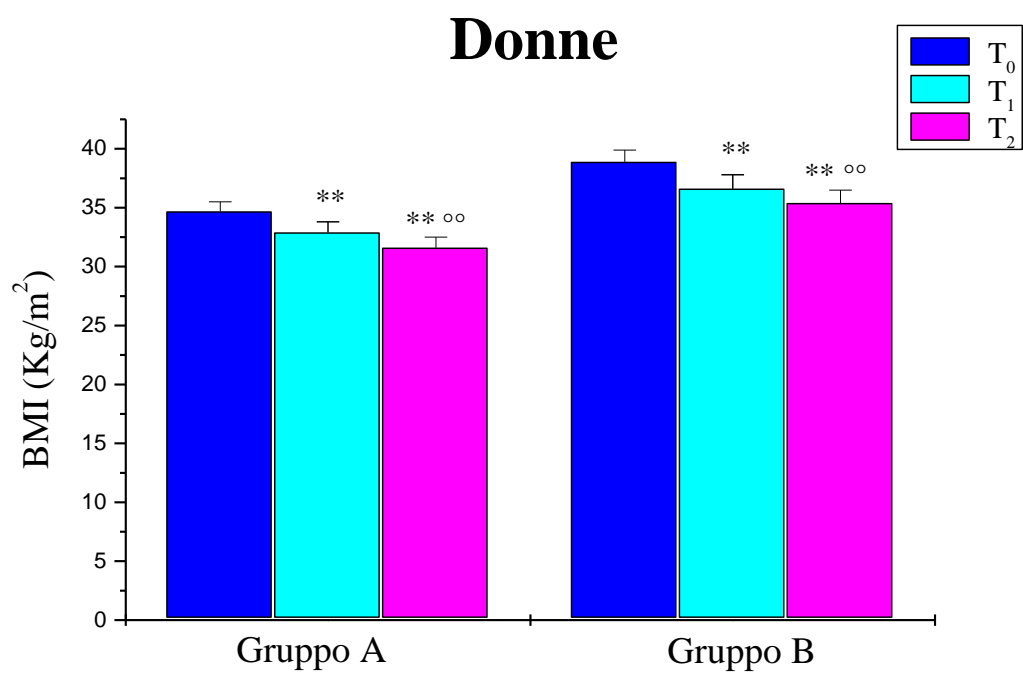
visita) ed indice HOMA ( $2.6 \pm 0.3$  vs  $5.2 \pm 0.4$ ,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 8.6),  
come riportato in tabella 8.2.

	GRUPPO A					
	DONNE (n=27)			UOMINI (n= 27)		
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
<b>Età</b>	59.0±1.5			61.3±1.8		
<b>BMI</b>	34.7±0.8	32.9±0.9**	31.6±0.9** °°	34.0±1.1	32.0±1.1**	30.3±0.9** °°
<b>CV</b>	105.2±2.1	101.8±2.1**	97.7±1.9** °°	112.9±2.5	108.4±2.5**	101.4±1.6** °°
<b>CF</b>	114.3±1.6	111.9±1.6**	108.7±1.5** °°	111.6±2.5	107.0±2.7**	104.8±2.2** °
<b>Plica tricipitale</b>	28.7±1.4	26.3±1.2**	24.2±1.1** °°	25.4±1.5	22.6±1.6**	20.1±1.4** °°
<b>MG (Kg)</b>	37.8±1.6	34.3±1.7**	31.7±1.5** °°	31.5±0.9	25.6±1.7**	21.9±1.5** °°
<b>MG (%)</b>	43.5±1.2	41.3±1.4**	39.9±1.0** °	31.4±0.9	26.9±0.9**	24.4±1.0** °°
<b>MM (Kg)</b>	48.6±1.1	47.7±0.9	47.0±0.7*	67.7±2.0	67.5±1.7	66.1±1.5*
<b>MM (%)</b>	56.5±1.2	58.7±1.4**	60.1±1.0**	68.6±0.9	73.1±0.9**	75.6±1.0** °°
<b>Col TOTALE</b>	224.7±9.3	195.5±4.4**	194.3±2.7**	200.1±6.7	197.7±5.6	182.3±3.1** °°
<b>Trigliceridi</b>	144.1±14.3	108.0±7.7**	106.7±7.7**	116.0±8.6	94.7±4.3*	90.4±4.8** °
<b>GOT</b>	21.8 ±2.0	20.4±1.2	20.3±1.2	19.1±0.9	18.8±1.0	18.7±1.0
<b>GPT</b>	29.5±4.3	23.7±2.3	23.5±2.4	23.3±2.7	20.0±1.0	19.9±1.1
<b>Glicemia</b>	89.9±2.4	89.2±2.5	87.3±2.3* °	93.3±1.7	92.8±1.8	90.7±1.9*
<b>Hb glicata</b>	5.5±0.9	5.3±0.5	5.3±0.2	5.7±1.0	5.5±1.3	5.2±0.6
<b>Insulina basale</b>	11.2±2.3	9.5±1.4	8.8±1.5	10.9±2.0	9.7±1.5	9.1±1.6
<b>Indice HOMA</b>	2.4±0.4	2.0±0.3	1.7±0.4	2.3±0.3	2.0±0.4	2.0±0.2

**Tabella 8.1.** Variazione dei parametri antropometrici [body mass index (BMI), circonferenza vita (CV), circonferenza fianchi (CF) e plica tricipitale], della composizione corporea [massa magra (MG) e massa grassa (MG)] e dei parametri ematochimici [colesterolo (Col) TOTALE e LDL, glicemia, emoglobina (Hb) glicata, insulina basale e transaminasi (GOT e GPT)] nelle donne e negli uomini appartenenti al gruppo A dopo 3 mesi (T<sub>0</sub>) e 6 mesi di trattamento dietetico (T<sub>1</sub>). \*p<0,05 vs tempo T<sub>0</sub>; \*\*p<0,01 vs tempo T<sub>0</sub>; °p<0,05 vs tempo T<sub>1</sub>; °°p<0,01 vs tempo T<sub>1</sub>.

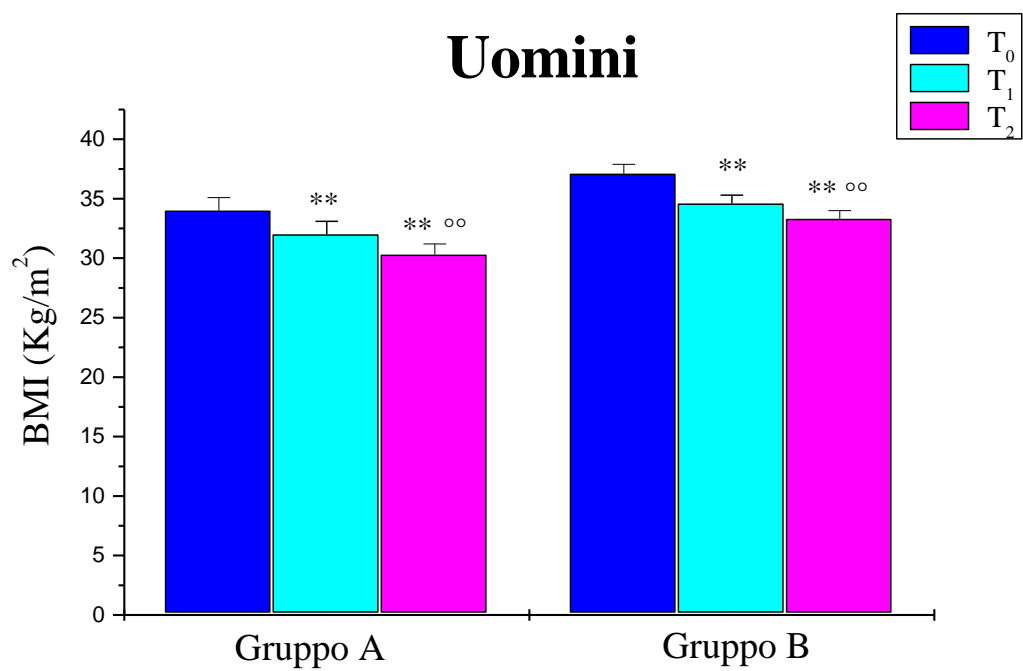
	GRUPPO B					
	DONNE (n=27)			UOMINI (n=27)		
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
<b>Età</b>	60.8±1.4			59.7±2.0		
<b>BMI</b>	38.9±1.0	36.6±1.2**	35.4±1.1** °°	37.1±0.8	34.6±0.7**	33.3±0.7** °°
<b>CV</b>	110.6±2.1	105.8±1.9**	103.8±1.8** °°	121.3±1.6	114.3±1.5**	110.3±1.6** °°
<b>CF</b>	120.1±2.2	116.7±2.5**	115.2±2.3** °°	114.9±1.4	110.3±1.4**	109.6±1.6** °
<b>Plica tricipitale</b>	34.0±0.8	30.4±1.1**	28.9±1.0** °°	29.2±1.0	23.9±0.7**	22.5±0.8**
<b>MG (Kg)</b>	42.9±2.1	39.4±1.7**	37.3±1.6** °°	34.8±1.8	30.9±0.9**	28.2±0.9** °°
<b>MG (%)</b>	45.6±1.1	44.7±0.8	43.7±1.1** °	31.6±1.0	30.4±0.4	28.9±0.5** °°
<b>MM (Kg)</b>	50.1±1.4	47.9±1.4**	47.3±1.4**	73.6±1.2	70.0±1.4**	69.0±1.5** °
<b>MM (%)</b>	54.4±1.1	55.2±0.8**	56.3±1.1** °°	68.4±1.0	69.6±0.4	71.1±0.5** °°
<b>Col TOTALE</b>	222.2±6.6	200.9±5.6**	195.7±4.4**	211.7±10.3	178.1±5.0**	176.0±5.8**
<b>Trigliceridi</b>	154.0±14.3	114.3±6.2**	107.3±6.2**	162.9±12.5	136.3±10.3*	123.1±9.3** °
<b>GOT</b>	24.1±2.3	19.4±0.7**	19.2±0.5**	24.4±1.5	22.2±1.3**	20.1±1.1**
<b>GPT</b>	29.7±3.3	24.0±0.8	23.6±0.9	36.4±3.2	31.1±2.6**	26.9±1.7**
<b>Glicemia</b>	121.8±3.2	102.2±1.7**	100.1±1.7** °°	139.5±6.8	115.0±3.5**	104.4±2.2** °°
<b>Hb glicata</b>	7.7±0.5	6.0±0.1**	5.4±0.5	7.1±0.8	5.9±0.1**	5.7±0.1**
<b>Insulina basale</b>	15.1±1.5	11.6±1.9**	9.6±2.1°°	15.1±1.2	11.5±1.8**	10.7±1.6**
<b>Indice HOMA</b>	4.5±0.4	2.8±0.3**	2,2±0.3**	5.2±0.4	3.1±0.3**	2.6±0.3**

**Tabella 8.2.** Variazione dei parametri antropometrici [body mass index (BMI), circonferenza vita (CV), circonferenza fianchi (CF) e plica tricipitale], della composizione corporea [massa magra (MG) e massa grassa (MG)] e dei parametri ematochimici [colesterolo (Col) TOTALE e LDL, glicemia, emoglobina (Hb) glicata, insulina basale e transaminasi (GOT e GPT)] nelle donne e negli uomini appartenenti al gruppo B dopo 3 mesi (T<sub>0</sub>) e 6 mesi di trattamento dietetico (T<sub>1</sub>). \*p<0,05 vs tempo T<sub>0</sub>; \*\*p<0,01 vs tempo T<sub>0</sub>; °p<0,05 vs tempo T<sub>1</sub>; °°p<0,01 vs tempo T<sub>1</sub>.



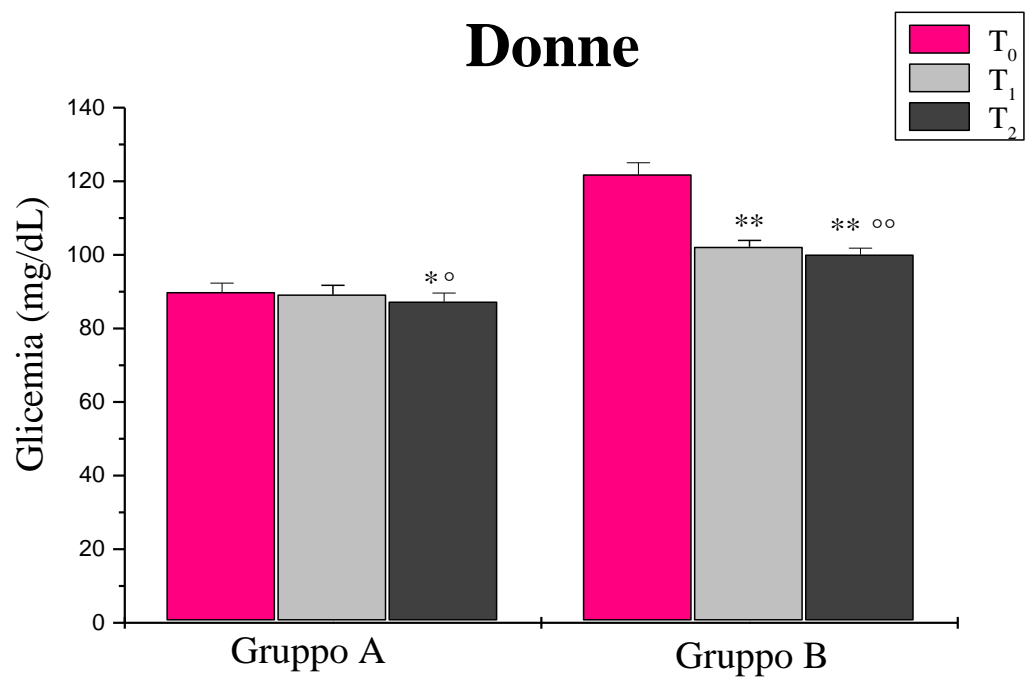
**Figura 8.1.** Variazione del BMI nelle donne appartenenti al gruppo A ed al gruppo B.

\*\*p<0,01 vs tempo T<sub>0</sub>; °°p<0,01 vs tempo T<sub>1</sub>.



**Figura 8.2.** Variazione del BMI negli uomini appartenenti al gruppo A ed al gruppo B.

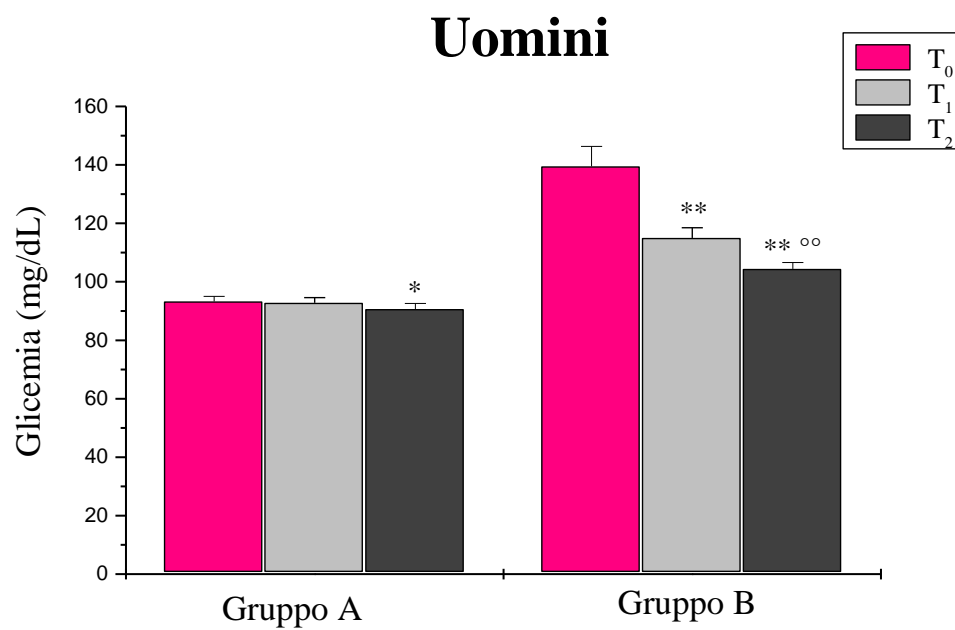
\*\*p<0,01 vs tempo T<sub>0</sub>; °°p<0,01 vs tempo T<sub>1</sub>.



**Figura 8.3.** Variazione dei valori di glicemia nelle donne appartenenti al gruppo A ed al gruppo B.

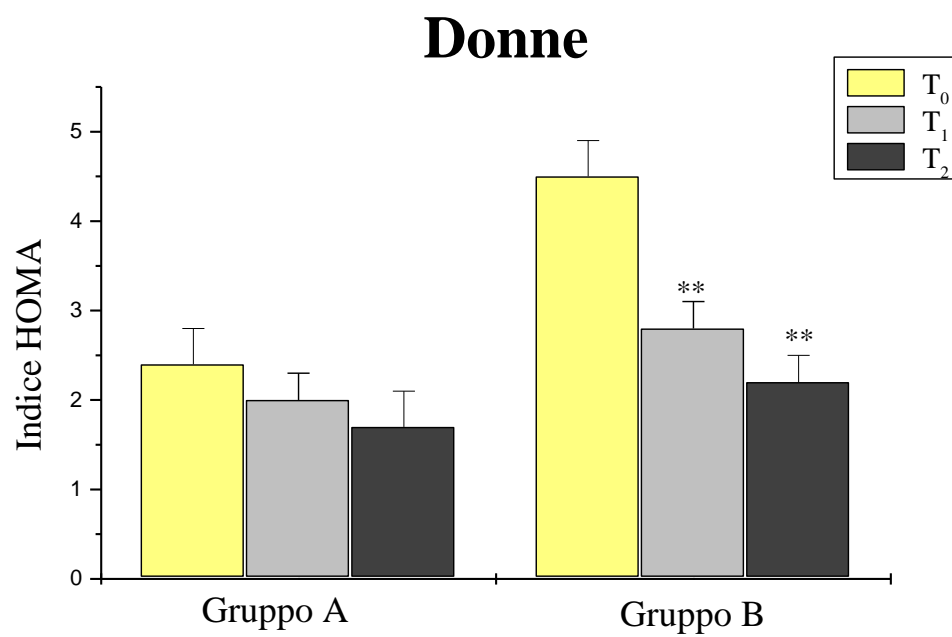
\*p<0,05 vs tempo T<sub>0</sub>; \*\*p<0,01 vs tempo T<sub>0</sub>; °p<0,05 vs tempo T<sub>1</sub>; °°p<0,01 vs tempo T<sub>1</sub>.



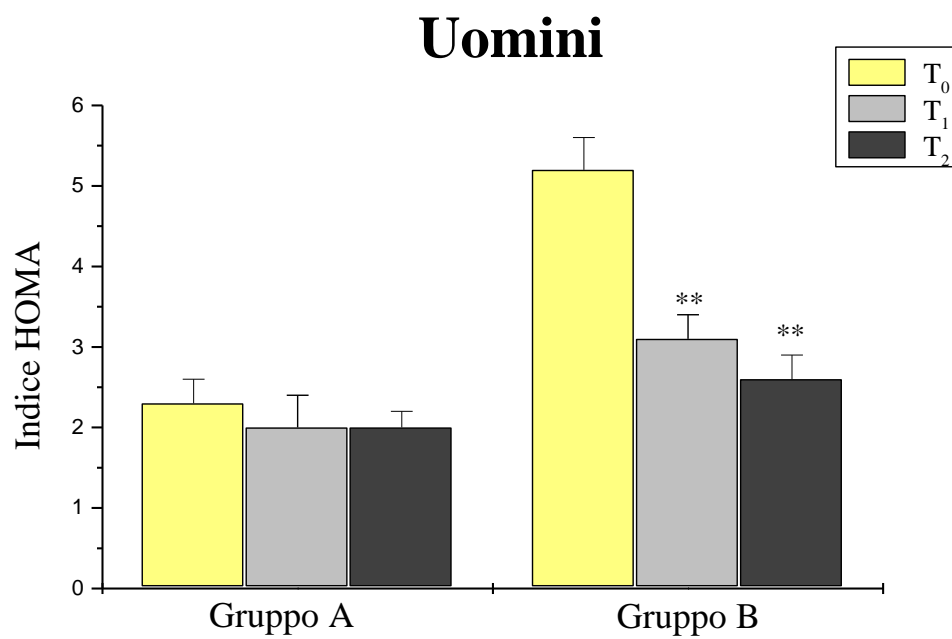


**Figura 8.4.** Variazione dei valori di glicemia negli uomini appartenenti al gruppo A ed al gruppo B.

\*p<0,05 vs tempo T<sub>0</sub>; \*\*p<0,01 vs tempo T<sub>0</sub>; °°p<0,01 vs tempo T<sub>1</sub>.



**Figura 8.5.** Variazione dell'indice HOMA nelle donne appartenenti al gruppo A ed al gruppo B.  
\*\*p<0,01 vs tempo T<sub>0</sub>.



**Figura 8.6.** Variazione dell'indice HOMA negli uomini appartenenti al gruppo A ed al gruppo B.  
\*\*p<0,01 vs tempo T<sub>0</sub>.

# Capitolo IX

## Studio del flusso microvascolare

I dati relativi allo studio del flusso microvascolare cutaneo, misurato in condizioni basali mediante la metodica LDPM, hanno messo in evidenza interessanti differenze tra i due gruppi di studio (Figure 9.1 e 9.2).

### 9.1. Gruppo A

Alla prima osservazione il flusso microvascolare cutaneo medio dei pazienti normoglicemici (gruppo A), misurato in condizioni basali, è risultato essere pari a  $11.8 \pm 0.4$  PU (Figura 9.3), mentre lo spettro di potenza totale medio è risultato essere pari a  $176.5 \pm 11.4$  PU<sup>2</sup>/Hz (Figura 9.4). L'analisi delle componenti di frequenza dello spettro di potenza delle oscillazioni del flusso ha evidenziato che le componenti di frequenza maggiormente rappresentate sono state quelle correlate con l'attività nervosa ( $34.0 \pm 0.9$  % dello spettro di potenza totale) e l'attività miogena intrinseca delle cellule muscolari arteriolari ( $34.9 \pm 0.7$  %), comprese rispettivamente negli intervalli di frequenza 0.021-0.052 e 0.052-0.145 Hz (Figura 9.5).

Dopo 3 mesi di trattamento dietetico, è stato evidenziato un significativo incremento sia del flusso microvascolare medio ( $13.3 \pm 0.3$  vs  $11.8 \pm 0.4$  PU,

p<0.01 vs I visita) (Figura 9.3) sia dello spettro di potenza totale medio ( $302.2 \pm 10.2$  vs  $176.5 \pm 11.4$  PU<sup>2</sup>/Hz, p<0.01 vs I visita) (Figura 9.4) in questo gruppo di pazienti. L'analisi spettrale del segnale laser Doppler ha, invece, evidenziato variazioni significative solo nella componente endoteliale NO-indipendente, compresa nell'intervallo di frequenza 0.005-0.0095 Hz, e in quella neurogena: in particolare, sono stati osservati un significativo aumento dell'ampiezza della componente endoteliale NO-indipendente ( $5.2 \pm 0.4$  vs  $2.6 \pm 0.2$  %, p<0.01 vs I visita) ed una significativa riduzione dell'ampiezza della componente neurogena ( $29.3 \pm 1.0$  vs  $34.0 \pm 0.9$ %, p<0.01 vs I visita). La componente di frequenza correlata con l'attività miogena non ha, invece, mostrato variazioni significative, sebbene sia stata osservata una tendenza verso l'incremento della sua ampiezza come riportato nella figura 9.8.

Dopo 6 mesi di trattamento dietetico, è stata osservato un ulteriore incremento del flusso microvascolare medio ( $14.0 \pm 0.5$  vs  $11.8 \pm 0.4$  PU, p<0.01 vs I visita) (Figura 9.3) e dello spettro di potenza totale medio ( $326.4 \pm 9.5$  vs  $176.5 \pm 11.4$  PU<sup>2</sup>/Hz, p<0.01 vs I visita) (Figura 9.4). In questo gruppo di pazienti, l'analisi spettrale del segnale laser Doppler non ha mostrato significative variazioni nelle singole componenti di frequenza rispetto ai 3 mesi precedenti (Figura 9.8).

## 9.2. Gruppo B

Alla prima osservazione, nei pazienti iperglicemici (gruppo B) il flusso microvascolare medio è risultato significativamente inferiore rispetto a quello osservato nei pazienti normoglicemici ( $9.4 \pm 0.3$  vs  $11.8 \pm 0.4$  PU,  $p < 0.01$  vs I visita gruppo A) (Figura 9.3). Allo stesso modo lo spettro di potenza totale è risultato significativamente inferiore nei pazienti del gruppo B rispetto a quello dei pazienti del gruppo A ( $113.2 \pm 10.1$  vs  $176.5 \pm 11.4$  PU<sup>2</sup>/Hz,  $p < 0.01$  vs I visita gruppo A) (Figura 9.4).

L'analisi spettrale del segnale laser Doppler ha evidenziato che, anche in questo gruppo di pazienti, le componenti di frequenza maggiormente rappresentate all'interno dello spettro di potenza totale sono state quelle correlate con le attività nervosa e miogena intrinseca delle cellule muscolari lisce. Sono state, però, evidenziate interessanti differenze confrontando le singole componenti di frequenza dei due gruppi di studio. In particolare, la componente di frequenza relativa all'attività miogena presentava una minore ampiezza rispetto a quella riscontrata nei pazienti del gruppo A ( $31.0 \pm 0.7$  vs  $34.9 \pm 0.7$  %,  $p < 0.01$  vs I visita gruppo A); mentre, la componente di frequenza relativa all'attività endoteliale NO-dipendente, compresa nell'intervallo di frequenza 0.0095-0.021 Hz, è risultata essere più elevata nel gruppo B rispetto al gruppo A ( $11.1 \pm 0.7$  vs  $7.9 \pm 0.3$  %,  $p < 0.01$  vs I visita gruppo A). Queste variazioni sono state accompagnate da significative differenze anche nelle componenti ad alta frequenza: l'ampiezza della componente correlata con l'attività respiratoria,

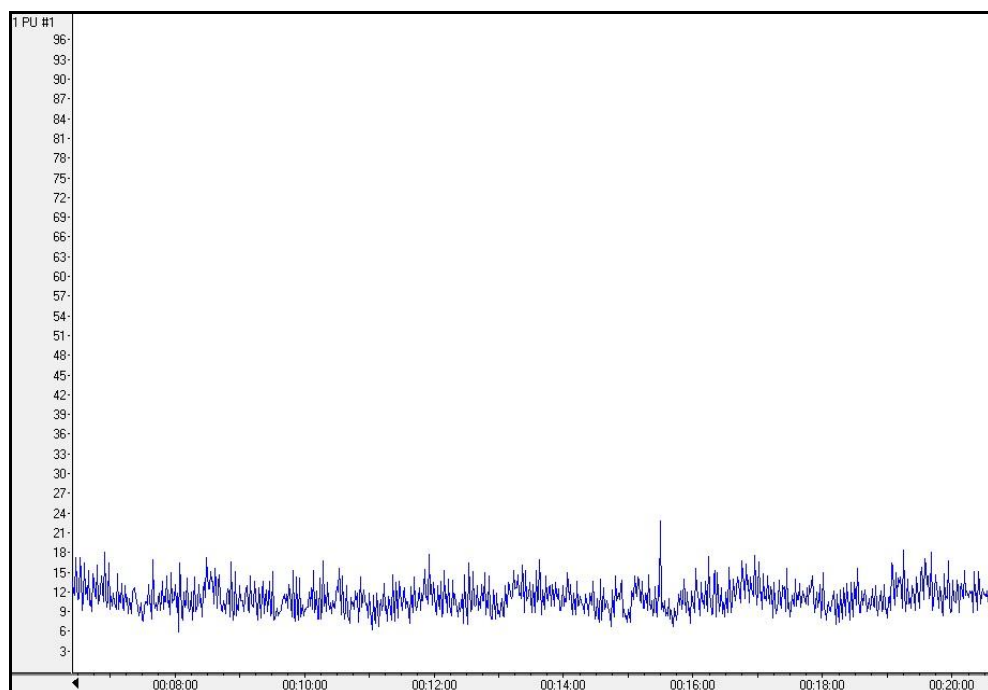
compresa nell'intervallo di frequenza 0.145-0.6 Hz, è risultata maggiore nel gruppo B rispetto al gruppo A ( $6.8 \pm 0.4$  vs  $10.1 \pm 0.6\%$ ,  $p < 0.01$  vs I visita gruppo A); mentre la componente relativa all'attività cardiaca, compresa nell'intervallo di frequenza 0.6-2.0 Hz, è risultata minore nel gruppo B rispetto al gruppo A ( $9.4 \pm 0.3$  vs  $10.5 \pm 1.0\%$ ,  $p < 0.01$  vs I visita gruppo A) (Figura 9.7).

Dopo 3 mesi di trattamento dietetico, i pazienti appartenenti al gruppo B hanno mostrato un incremento significativo del flusso microvascolare cutaneo medio ( $11.1 \pm 0.2$  vs  $9.4 \pm 0.3$  PU,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 9.3) e dello spettro di potenza totale medio ( $244.7 \pm 9.9$  vs  $113.2 \pm 10.1$  PU<sup>2</sup>/Hz,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 9.4). L'analisi spettrale del segnale laser Doppler ha mostrato una riduzione della componente endoteliale NO-dipendente ( $9.4 \pm 0.9$  vs  $11.1 \pm 0.7$  %,  $p < 0.01$  vs I visita gruppo A), che ha raggiunto un valore simile a quello osservato nei pazienti del gruppo A. È stato, inoltre, osservato un significativo recupero dello spettro di potenza relativo alla componente di frequenza corrispondente all'attività miogena ( $35.4 \pm 1.5$  vs  $31.0 \pm 0.7$  %,  $p < 0.01$  vs I visita). Allo stesso modo anche le ampiezze della componente relativa all'attiva nervosa e quelle delle componenti ad alta frequenza hanno subito variazioni significative, avvicinandosi ai valori osservati nel gruppo A (Figura 9.9).

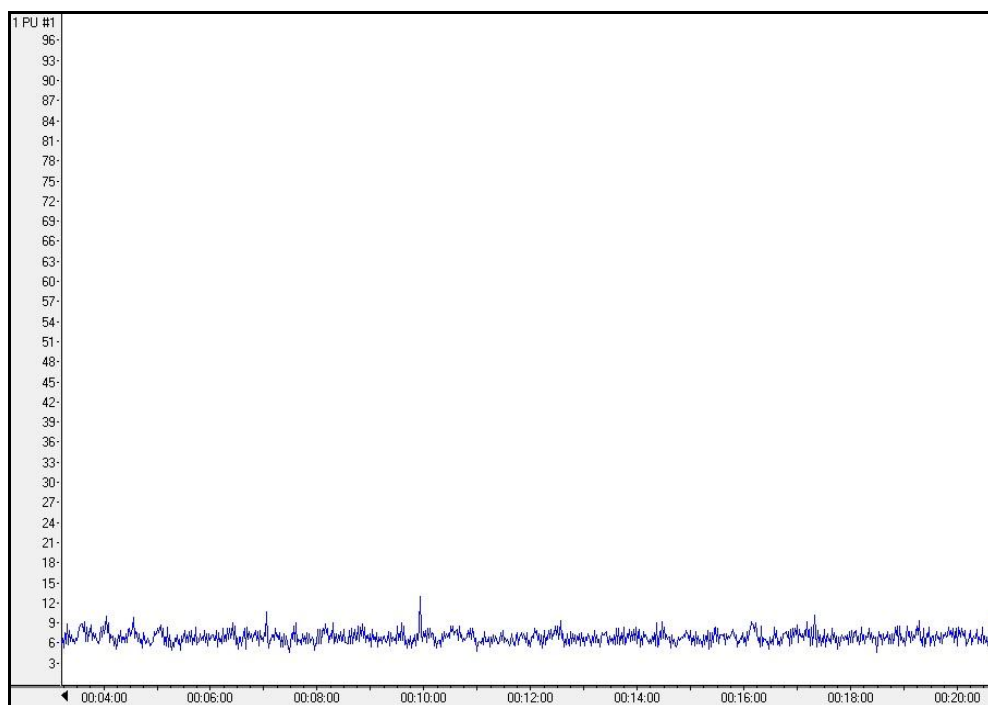
Dopo 6 mesi di trattamento, in questo gruppo di pazienti, è stata osservato un ulteriore aumento del flusso microvascolare medio ( $12.3 \pm 0.4$  vs  $9.4 \pm 0.3$  PU,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 9.3) e dello spettro di potenza totale ( $323.3 \pm 10.1$  vs  $113.2 \pm 10.1$  PU<sup>2</sup>/Hz,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 9.4). In questo gruppo di

pazienti, l'analisi spettrale del segnale laser Doppler non ha mostrato significative variazioni nelle singole componenti di frequenza rispetto ai 3 mesi precedenti (Figura 9.9).

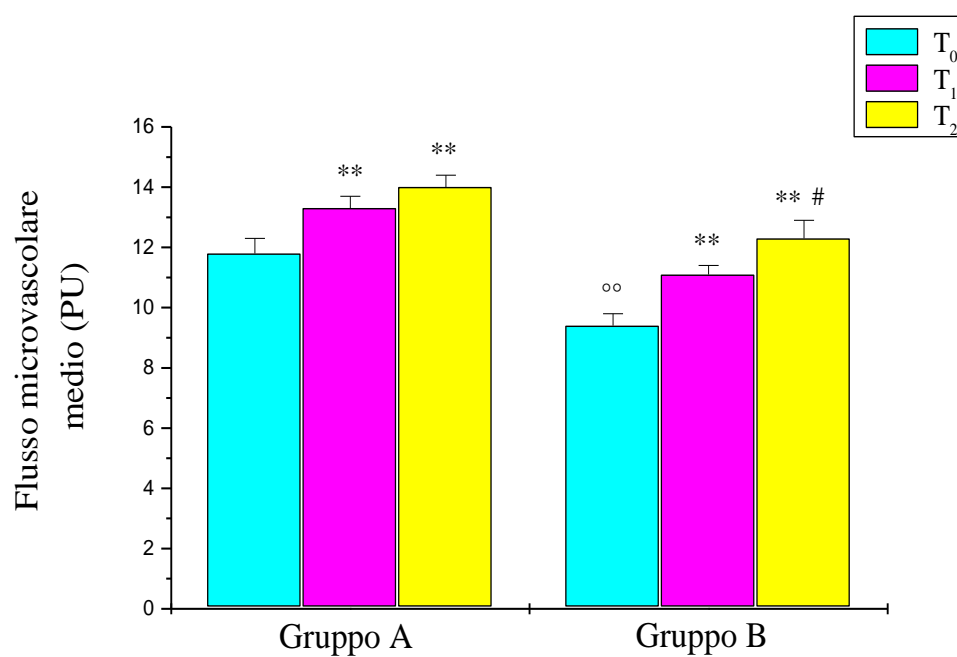




**Figura 9.1.** Tracciato laser Doppler di un paziente appartenente al gruppo A (Tempo  $T_0$ ).

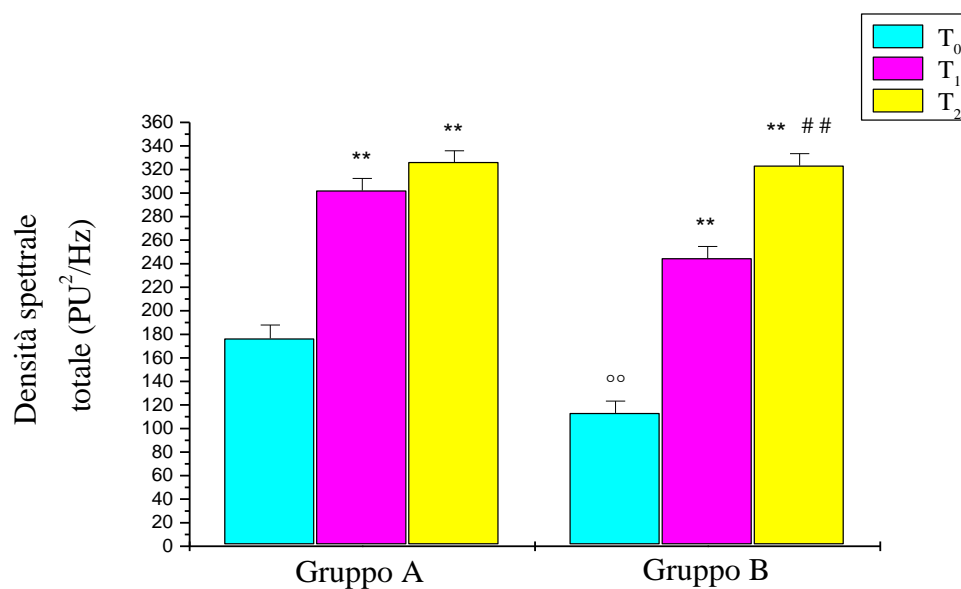


**Figura 9.2.** Tracciato laser Doppler di un paziente appartenente al gruppo B (Tempo  $T_0$ ).



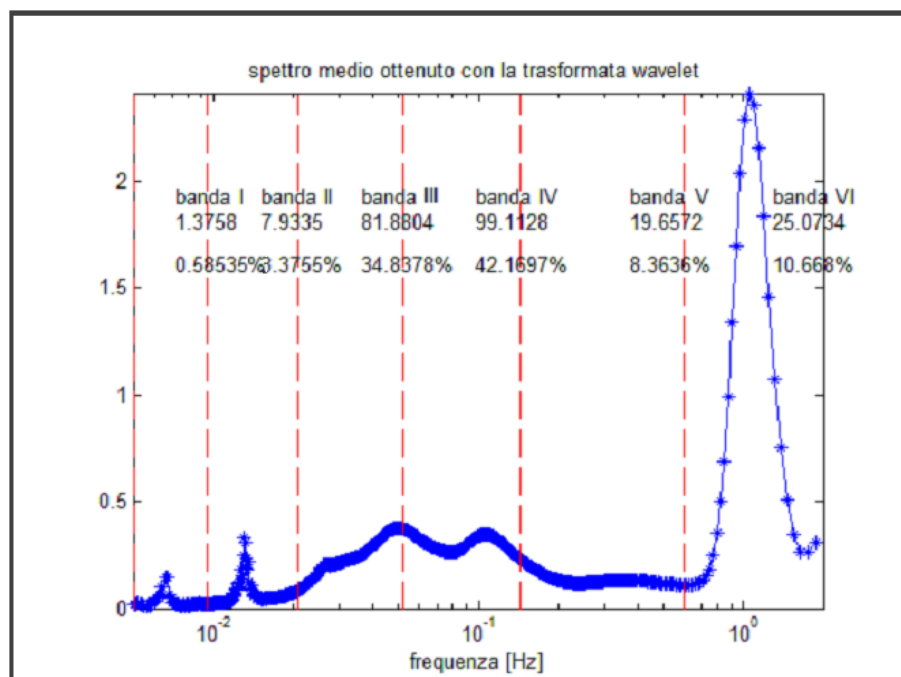
**Figura 9.3.** Variazione del flusso microvascolare cutaneo medio, espresso in PU, alla prima osservazione (Tempo T<sub>0</sub>), dopo 3 (Tempo T<sub>1</sub>) e 6 mesi (Tempo T<sub>2</sub>) di trattamento dietetico nei due gruppi di studio.

\*\* p<0,01 vs I visita, <sup>oo</sup> p<0,01 vs I visita Gruppo A, # p<0,05 vs II visita.

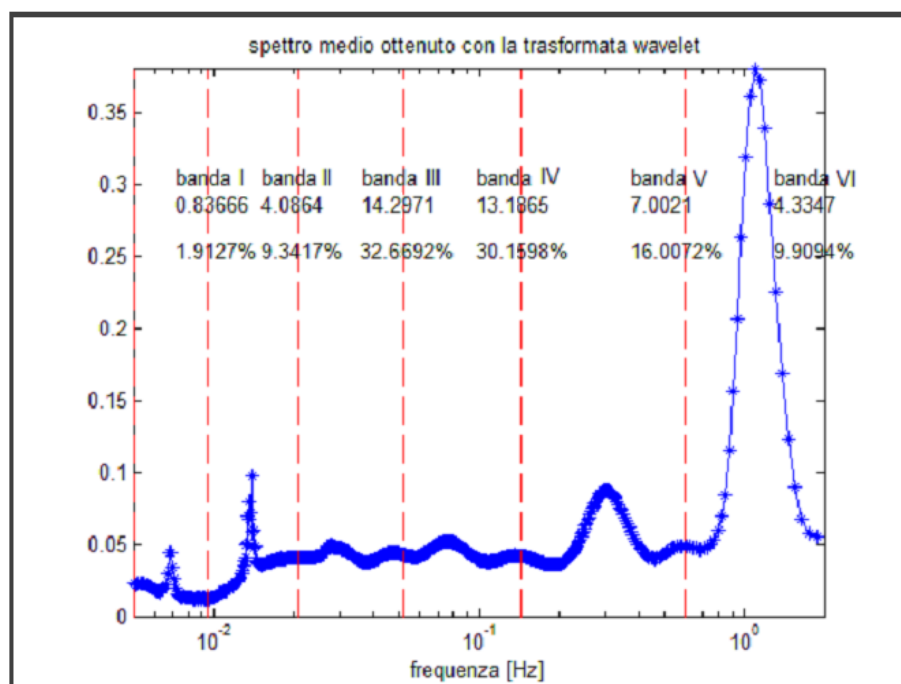


**Figura 9.4.** Variazione dello spettro di potenza totale medio, espresso in  $PU^2/Hz$ , alla prima osservazione (Tempo  $T_0$ ), dopo 3 (Tempo  $T_1$ ) e 6 mesi (Tempo  $T_2$ ) di trattamento dietetico nei due gruppi di studio.

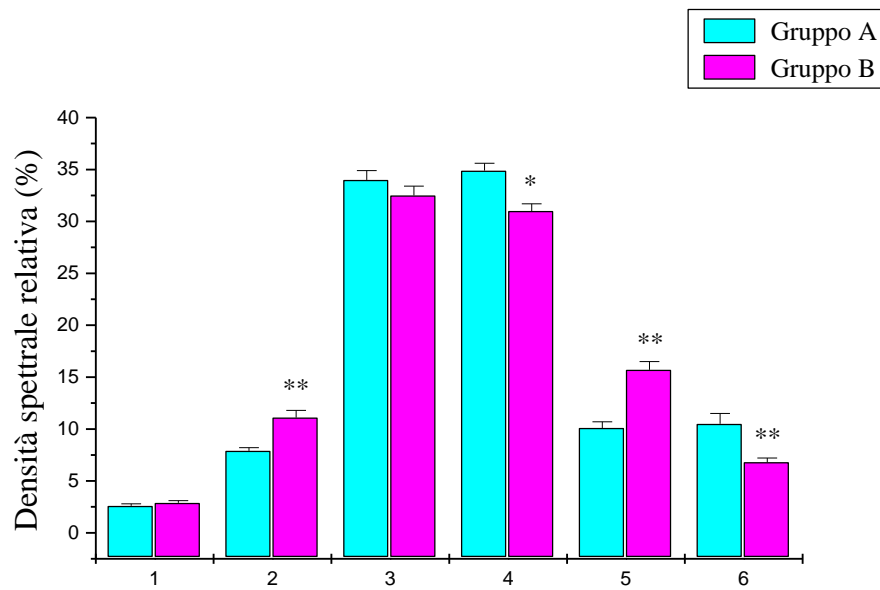
\*\*  $p < 0,01$  vs I visita, <sup>oo</sup>  $p < 0,01$  vs I visita Gruppo A, ##  $p < 0,01$  vs II visita.



**Figura 9.5.** Analisi spettrale di un tracciato laser Doppler di un paziente appartenente al gruppo A (Tempo  $T_0$ ).

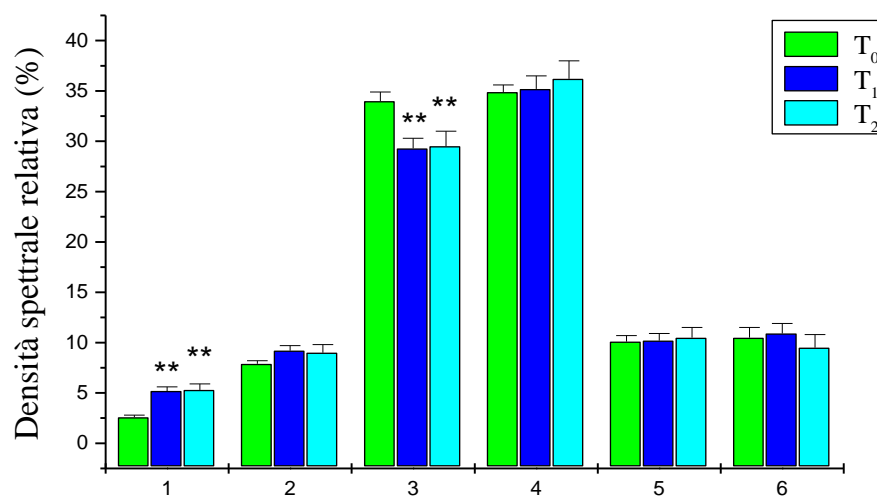


**Figura 9.6.** Analisi spettrale di un tracciato laser Doppler di un paziente appartenente al gruppo B (Tempo  $T_0$ ).



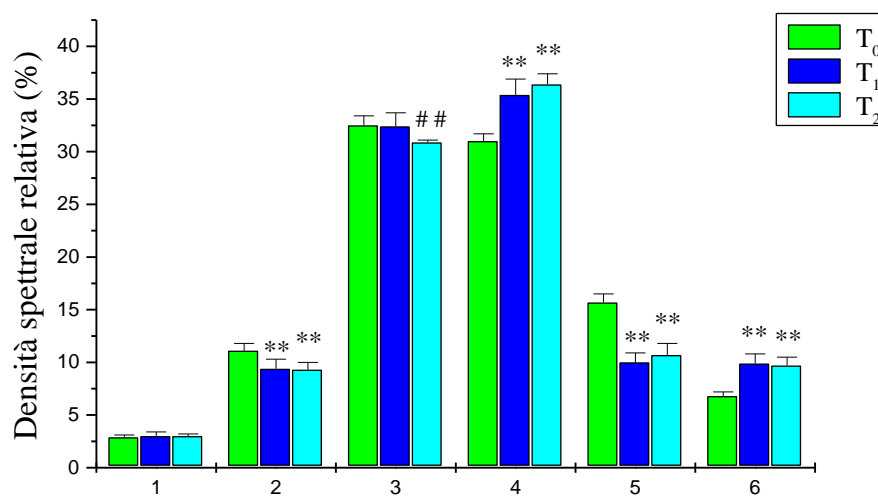
**Figura 9.7.** Variazione degli spettri di potenza relativi ad attività endoteliale NO-indipendente (1), attività endoteliale NO-dipendente (2), attività neurogena (3), attività miogena intrinseca (4), attività respiratoria (5), attività cardiaca (6) alla prima osservazione (Tempo  $T_0$ ) nei due gruppi di studio.

\*  $p < 0,05$  vs I visita Gruppo A, \*\*  $p < 0,01$  vs I visita Gruppo A.



**Figura 9.8.** Variazione degli spettri di potenza relativi ad attività endoteliale NO-indipendente (1), attività endoteliale NO-dipendente (2), attività neurogena (3), attività miogena intrinseca (4), attività respiratoria (5), attività cardiaca (6) alla prima osservazione (Tempo T<sub>0</sub>), dopo 3 (Tempo T<sub>1</sub>) e 6 mesi (Tempo T<sub>2</sub>) di trattamento dietetico nel gruppo A.

\*\* p< 0,01 vs I visita.



**Figura 9.9.** Variazione degli spettri di potenza relativi ad attività endoteliale NO-indipendente (1), attività endoteliale NO-dipendente (2), attività neurogena (3), attività miogena intrinseca (4), attività respiratoria (5), attività cardiaca (6) alla prima osservazione (Tempo T<sub>0</sub>), dopo 3 (Tempo T<sub>1</sub>) e 6 mesi (Tempo T<sub>2</sub>) di trattamento dietetico nel gruppo A.

\*\* p < 0,01 vs I visita, ## p < 0,01 vs II visita.

## Capitolo X

### Studio dell'iperemia reattiva *post-ischemica*

In 14 pazienti normoglicemici (7 femmine) e 16 pazienti iperglicemici (8 femmine), dei 108 pazienti reclutati, è stato studiato il flusso microvascolare mediante LDPM sia in condizioni basali sia dopo 2 minuti di occlusione dell'arteria brachiale al fine di studiare l'iperemia reattiva *post-ischemica*. In questi pazienti, la valutazione della risposta iperemica è stata effettuata alla prima osservazione (Figure 10.1 e 10.2), dopo 3 e 6 mesi di trattamento dietetico.

#### 10.1. Gruppo A

Dopo 2 minuti di ischemia, nei pazienti normoglicemici (gruppo A), è stato osservato incremento massimo del flusso microvascolare del  $552.0 \pm 27.4$  % rispetto al flusso microvascolare registrato in condizioni basali ( $p < 0,01$  vs flusso basale) (Figura 10.3). Il picco massimo raggiunto in questi pazienti è stato, infatti, pari a  $60.3 \pm 2.5$  PU (Figura 10.4); mentre il tempo trascorso per raggiungere il picco massimo è risultato pari a  $7.1 \pm 0.3$  sec (Figura 10.5). Infine, il flusso microvascolare ha raggiunto i valori, registrati in condizioni basali, dopo  $41.9 \pm 2.2$  sec (Figura 10.6).



La risposta iperemica, valutata dopo 3 mesi di trattamento dietetico, ha mostrato interessanti variazioni. In particolare, è stato osservato un maggiore incremento massimo del flusso microvascolare ( $650.2 \pm 24.1$  vs  $552.0 \pm 27.4$  %,  $p < 0,01$  vs I visita) (Figura 10.3), accompagnato da un altrettanto significativo aumento del picco massimo raggiunto durante l'iperemia reattiva ( $64.9 \pm 0.8$  vs  $60.3 \pm 2.5$  PU,  $p < 0,05$  vs I visita) (Figura 10.4). Invece, il tempo trascorso per raggiungere il picco massimo è risultato significativamente più breve ( $6.1 \pm 0.4$  vs  $7.1 \pm 0.3$  sec,  $p < 0,05$  vs I visita) (Figura 10.5). Infine, la durata della risposta iperemica *post-ischemica* è apparsa significativamente più lunga ( $55.0 \pm 2.0$  vs  $41.9 \pm 2.2$  sec,  $p < 0,01$  vs I visita) (Figura 10.6).

Dopo 6 mesi di trattamento dietetico, è stato osservato un ulteriore miglioramento dell'iperemia reattiva *post-ischemica*. In particolare, l'incremento massimo del flusso microvascolare è risultato ulteriormente aumentato ( $750.4 \pm 24.0$  vs  $552.0 \pm 27.4$  %,  $p < 0,01$  vs I visita) (Figura 10.3), così come il picco massimo raggiunto durante l'iperemia reattiva ( $69.0 \pm 0.2$  vs  $60.3 \pm 2.5$  PU,  $p < 0,01$  vs I visita) (Figura 10.4). Il tempo trascorso per raggiungere il picco massimo è, invece, risultato paragonabile a quello osservato dopo 3 mesi di trattamento dietetico (Figura 10.5), mentre la durata dell'iperemia reattiva è apparsa ulteriormente più lunga ( $53.9 \pm 2.1$  vs  $41.9 \pm 2.2$  sec,  $p < 0,01$  vs I visita) (Figura 10.6).

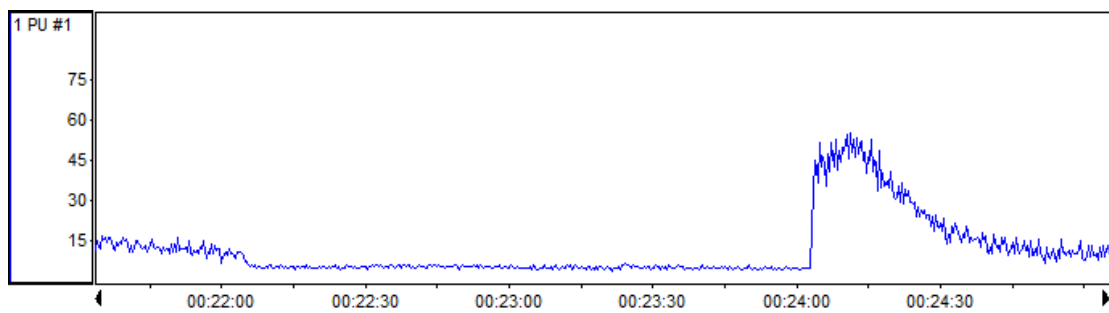
## 10.2. Gruppo B

Nei pazienti iperglicemici (gruppo B), l'occlusione dell'arteria brachiale e la successiva riapertura hanno stimolato una risposta iperemica significativamente differente rispetto a quella osservata nei pazienti iperglicemici.

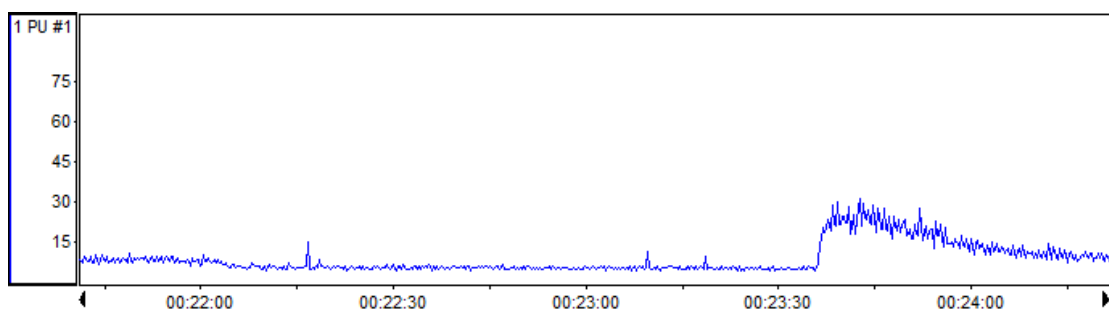
I pazienti, appartenenti al gruppo B, hanno mostrato un incremento massimo del flusso microvascolare significativamente inferiore rispetto a quello osservato nei pazienti normoglicemici ( $345.3 \pm 28.0$  vs  $552.0 \pm 27.4$  %,  $p < 0.01$  vs I visita gruppo A) (Figura 10.3) così come il picco iperemico ( $30.8 \pm 2.9$  vs  $60.3 \pm 2.5$  PU,  $p < 0.01$  vs I visita gruppo A) (Figura 10.4). Allo stesso tempo, è stato evidenziato un tempo al picco più lungo nei pazienti iperglicemici rispetto a quelli normoglicemici ( $9.2 \pm 0.5$  vs  $7.1 \pm 0.3$  sec,  $p < 0.01$  vs I visita gruppo A) (Figura 10.5), accompagnato da una più breve durata della risposta iperemica ( $30.1 \pm 1.2$  vs  $41.9 \pm 2.2$  sec,  $p < 0.01$  vs I visita gruppo A) (Figura 10.6).

Dopo 3 mesi di trattamento dietetico, i pazienti iperglicemici hanno mostrato un significativo aumento dell'incremento massimo del flusso microvascolare ( $624.2 \pm 26.1$  vs  $345.3 \pm 28.0$  %,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 10.3) e del picco iperemico ( $62.1 \pm 0.4$  vs  $30.8 \pm 1.6$  PU,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 10.4). Il tempo al picco è risultato significativamente più breve ( $7.6 \pm 0.4$  vs  $9.2 \pm 0.5$  sec,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 10.5), mentre la durata della risposta iperemica è aumentata in maniera significativa ( $33.0 \pm 0.5$  vs  $30.1 \pm 1.2$  sec,  $p < 0.05$  vs I visita) (Figura 10.6).

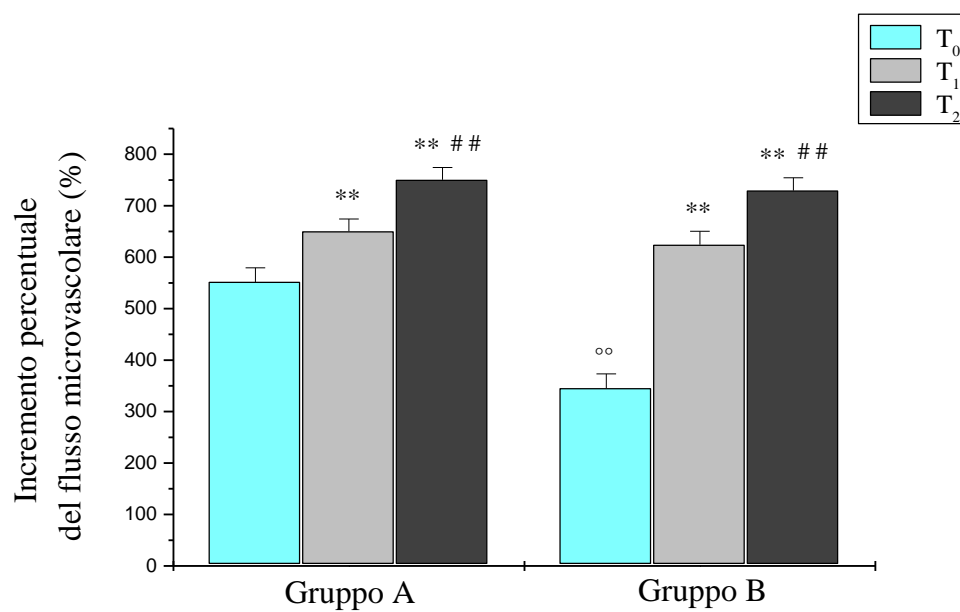
Dopo 6 mesi di trattamento i pazienti iperglicemici hanno mostrato un ulteriore miglioramento della risposta iperemica. In particolare, l'incremento massimo del flusso microvascolare è apparso ulteriormente aumentato ( $729.4 \pm 24.9$  vs  $345.3 \pm 28.0$  %,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 10.3), così come il picco massimo raggiunto durante l'iperemia reattiva ( $68.0 \pm 0.2$  vs  $30.8 \pm 1.6$  PU,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 10.4). Il tempo al picco è, invece, risultato ulteriormente più breve ( $6.0 \pm 0.5$  vs  $9.2 \pm 0.5$  sec,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 10.5), mentre la durata dell'iperemia reattiva è risultata ulteriormente più lunga ( $36.4 \pm 0.8$  vs  $30.1 \pm 1.2$  sec,  $p < 0.01$  vs I visita) (Figura 10.6).



**Figura 10.1.** Risposta iperemica in un paziente appartenente al gruppo A (Tempo  $T_0$ ).

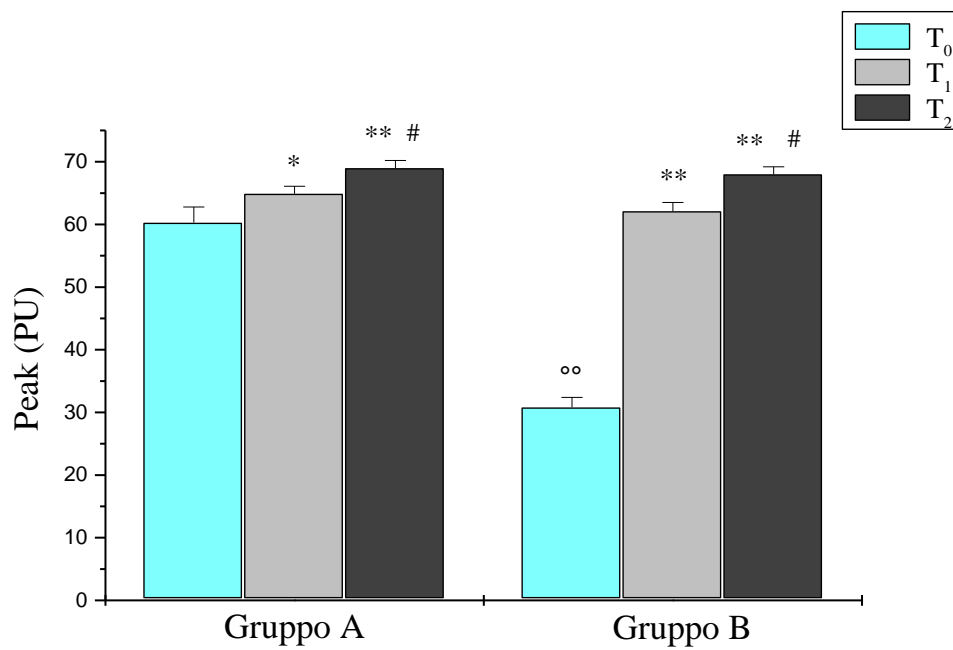


**Figura 10.2.** Risposta iperemica in un paziente appartenente al gruppo B (Tempo  $T_0$ ).



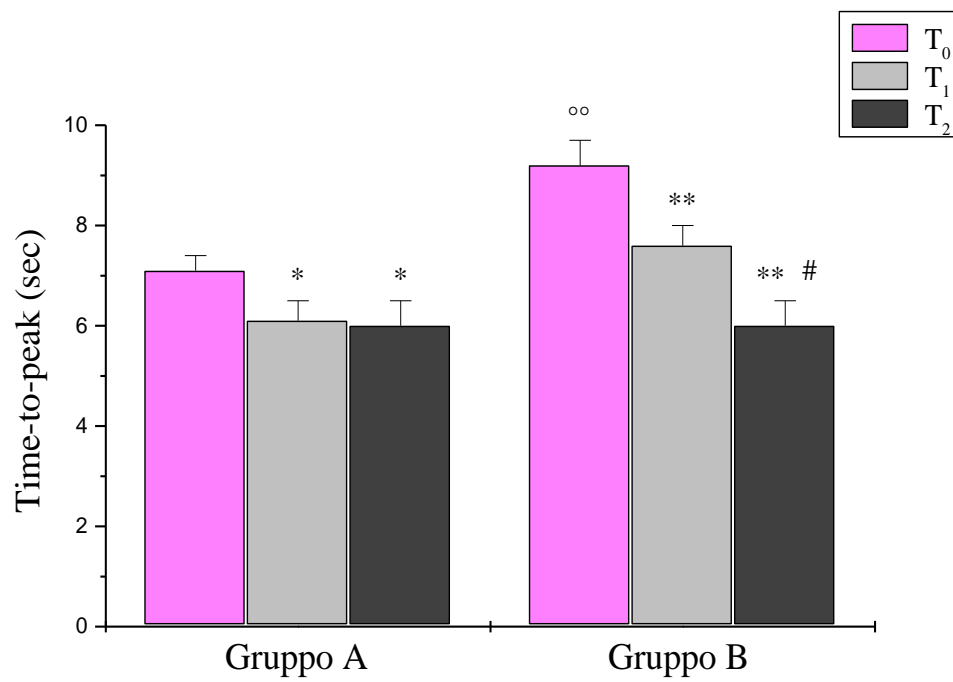
**Figura 10.3.** Incremento percentuale massimo del flusso microvascolare cutaneo durante l'iperemia reattiva nei due gruppi di studio.

\*\*  $p < 0,01$  vs I visita, °°  $p < 0,01$  vs I visita Gruppo A, ##  $p < 0,01$  vs II visita.



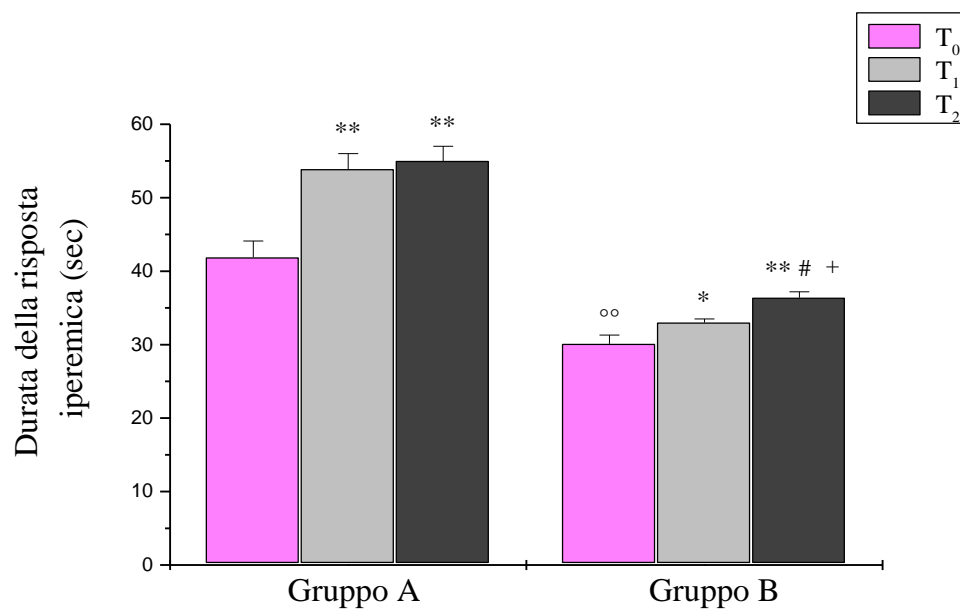
**Figura 10.4.** Variazione del picco massimo raggiunto durante l'iperemia reattiva nei due gruppi di studio.

\*  $p < 0,05$  vs I visita, \*\*  $p < 0,01$  vs I visita, <sup>oo</sup>  $p < 0,01$  vs I visita Gruppo A, #  $p < 0,05$  vs II visita.



**Figura 10.5.** Variazione del tempo trascorso per raggiungere il picco massimo nei due gruppi di studio.

\*  $p < 0,05$  vs I visita, \*\*  $p < 0,01$  vs I visita, <sup>°°</sup>  $p < 0,01$  vs I visita Gruppo A, #  $p < 0,05$  vs II visita.



**Figura 10.6.** Variazione della durata della risposta iperemica nei due gruppi di studio.

\*  $p < 0,05$  vs I visita, \*\*  $p < 0,01$  vs I visita, <sup>oo</sup>  $p < 0,01$  vs I visita Gruppo A, #  $p < 0,05$  vs II visita, #  
#  $p < 0,01$  vs II visita, +  $p < 0,01$  vs II visita Gruppo A.



# Discussione e conclusioni

---

I dati ottenuti in questo studio hanno dimostrato che i pazienti obesi, in cui era stata diagnosticata di recente l'iperglicemia e la condizione di insulino-resistenza, mostrano un netto miglioramento dello stato nutrizionale ed una significativa riduzione dei parametri ematochimici dopo 6 mesi di trattamento con un regime dietetico appropriato.

I pazienti appartenenti al gruppo A, con valori di glicemia inferiori a 110 mg/dL alla prima osservazione, hanno mostrato una riduzione significativa dei parametri antropometrici (BMI, circonferenza vita, circonferenza fianchi e plica tricipitale). Inoltre, i pazienti normoglicemici hanno mostrato un miglioramento della composizione corporea, infatti, è stato osservato un significativo decremento della massa grassa espressa sia in Kg sia in percentuale, accompagnata da un significativo aumento della percentuale di massa magra.

Allo stesso modo, i pazienti appartenenti al gruppo B, con valori di glicemia superiori a 110 mg/dL alla prima osservazione, hanno mostrato una riduzione significativa di BMI, circonferenza vita, circonferenza fianchi e plica tricipitale. Anche in questi pazienti, la riduzione dei parametri antropometrici è stata accompagnata da significativa riduzione della massa grassa, espressa sia in Kg sia in percentuale, e da un significativo incremento della percentuale di massa

magra. Inoltre, nei pazienti iperglicemici la riduzione dei parametri antropometrici ed il miglioramento della composizione corporea sono stati accompagnati da un miglioramento del profilo glucidico e della condizione di insulino-resistenza.

In tutti i pazienti, inoltre, abbiamo studiato il flusso microvascolare cutaneo mediante la metodica LDPM. La cute rappresenta un organo facilmente accessibile e la regolazione della sua microcircolazione non si differenzia da quella presente in altri distretti vascolari; pertanto, costituisce un modello eccellente per la valutazione dello stato della microcircolazione sistemica nelle prime fasi dell'iperglicemia così come in molte altre malattie [84, 85].

I nostri dati hanno mostrato un'alterazione del flusso microvascolare nei pazienti iperglicemici rispetto a quelli normoglicemici. In particolare, alla prima osservazione i pazienti iperglicemici presentavano un flusso microvascolare medio, espresso in PU, ed uno spettro di potenza totale significativamente inferiori rispetto ai pazienti normoglicemici. Il dato interessante è stato che il flusso microvascolare cutaneo è risultato influenzato dall'alimentazione in entrambe le popolazioni di pazienti: dopo 6 mesi di trattamento con dieta ipocalorica il flusso microvascolare medio e lo spettro di potenza totale sono aumentati sia nel gruppo A sia nel gruppo B, anche se valori più elevati sono stati registrati nei pazienti appartenenti al gruppo A.

È stato possibile studiare anche le diverse componenti di frequenza che caratterizzano lo spettro di potenza complessivo mediante analisi spettrale. Stefanovska et al. hanno identificato, utilizzando tecniche non invasive, sei

componenti di frequenza presenti nelle oscillazioni del flusso ematico cutaneo. Questi dati indicano che le componenti a bassa frequenza corrispondono alle attività endoteliali NO-indipendente ed NO-dipendente, nervosa e miogena, mentre le componenti ad alta frequenza sono correlate alla frequenza cardiaca e a quella respiratoria [75].

L'analisi spettrale delle oscillazioni del flusso microvascolare, effettuata su tutti i pazienti reclutati per lo studio, ha mostrato che alla prima osservazione i pazienti normoglicemici presentavano una maggiore distribuzione delle diverse componenti di frequenza nello spettro complessivo, con una prevalenza della componente miogena e di quella neurogena all'interno dello spettro di potenza totale. Nei pazienti iperglicemici è stato osservato lo stesso andamento; però, la componente di frequenza relativa all'attività miogena ha mostrato una minore ampiezza rispetto a quella riscontrata nei pazienti normoglicemici, indicando la compromissione della contrattilità delle cellule muscolari vasali. È stato interessante notare che l'alterazione della capacità contrattile delle cellule muscolari lisce è stata accompagnata, in questi pazienti, da un'iperattivazione dell'attività endoteliale NO-dipendente. Dopo 6 mesi di trattamento con la dieta ipocalorica è stato osservato un netto aumento della componente miogena ed una riduzione significativa di quella endotelale in questi pazienti, indicando una migliore funzionalità sia delle cellule muscolari arteriolari sia di quelle endoteliali.

Questi dati sono stati confermati dallo studio del flusso microvascolare dopo l'occlusione dell'arteria brachiale effettuata su un campione di 30 pazienti. Infatti, alla prima osservazione è stata evidenziata un'alterata risposta iperemica nei pazienti iperglicemici: dopo 2 minuti di ischemia, l'incremento massimo del flusso microvascolare e il picco massimo raggiunto durante l'iperemia sono risultati significativamente più bassi nei pazienti iperglicemici rispetto a quelli normoglicemici; mentre il tempo al picco è più lungo rispetto alla durata della risposta iperemica che è più breve nei pazienti iperglicemici rispetto a quelli normoglicemici. Dopo 6 mesi di trattamento dietetico è stato osservato un miglioramento del flusso microvascolare anche dopo l'occlusione dell'arteria brachiale in questo gruppo di pazienti.

Numerosi mediatori intervengono nell'iperemia reattiva *post-ischemica*: neuroni sensitivi attraverso riflessi assonali o differenti mediatori locali come canali del potassio calcio-dipendenti, che fanno ipotizzare il coinvolgimento del fattore iperpolarizzante (*Endothelium-derived hyperpolarizing factor*, EDHF), ed NO; pertanto, questa metodica più che valutare esclusivamente la funzione endoteliale vascolare permette di individuare cambiamenti che interessano l'intera funzione microvascolare [137].

Sulla base dei dati ottenuti è possibile affermare che la condizione di insulino-resistenza e di iperglicemia comporta un'alterazione del flusso microvascolare, misurato sia in condizioni basali sia dopo stimolazione acuta con occlusione dell'arteria brachiale. In particolare, le componenti di frequenza

correlate con l'attività miogena delle cellule muscolari lisce e l'attività endoteliale NO-dipendente sono quelle maggiormente alterate, presumibilmente, per effetto combinato dell'insulina e dello stress ossidativo indotto dall'iperglicemia [96, 129]. È possibile ipotizzare che, nelle prime fasi dell'insulino-resistenza, gli elevati livelli di insulina possano agire stimolando l'attività delle cellule endoteliali a produrre NO. Contemporaneamente all'azione dell'insulina, l'iperglicemia crea una condizione di stress ossidativo che danneggia la funzionalità sia dell'endotelio sia delle cellule muscolari lisce.

D'altra parte, il miglioramento dello stato nutrizionale e, soprattutto, del profilo glucidico è stato accompagnato da un miglioramento del flusso microvascolare, sia in condizioni basali che dopo occlusione dell'arteria brachiale. Pertanto, possiamo concludere che l'insulina e l'iperglicemia giocano un ruolo prominente nella patogenesi della disfunzione microvascolare.

# BIBLIOGRAFIA

---

1. *Circolazione sistemica: microcircolazione sistemica, sistemi venoso e linfatico, ed emoreologia.* In: Autori vari. *Fisiologia medica a cura di Fiorenzo Conti.* Seconda edizione. Volume 2. Edi-ermes. 2010.
2. Sun D, Huang A, Kaley G. *Mechanical compression elicits NO-dependent increases in coronary flow.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004; 287:H2454–60.
3. Sun D, Huang A, Sharma S, Koller A, Kaley G. *Endothelial microtubule disruption blocks flow-dependent dilation of arterioles.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001; 280:H2087–93.
4. Liu Y, Li H, Bubolz AH, Zhang DX, Gutterman DD. *Endothelial cytoskeletal elements are critical for flow-mediated dilation in human coronary arterioles.* Med Biol Eng Compu 2008; 46:469–78.
5. Su Y, Edwards-Bennett S, Bubb MR, Block ER. *Regulation of endothelial nitric oxide synthase by the actin cytoskeleton.* Am J Physiol Cell Physiol 2003; 284:C1542–9.
6. Su Y, Zharikov SI, Block ER. *Microtubule-active agents modify nitric oxide*

- production in pulmonary artery endothelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282:L1183–9.
7. Brum Cde A, Duarte ID, Webb RC, Leite R. *Disruption of microtubular network attenuates histamine-induced dilation in rat mesenteric vessels. Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288:C443–9.
  8. Rhodin JAG. *Architecture of the vessel wall*. In: Bohr DF, Somlyo AP, Sparks HV (eds). *Handbook of Physiology*. American Physiological Soc., Washington, DC, 1980. Ch 1–31.
  9. Yu PK, Yu D, Alder VA, Seydel U, Su E, Cringle SJ. *Heterogeneous endothelial cell structure along the porcine retinal microvasculature. Exp Eye Res* 1997; 65:379–89.
  10. Thurston G, Baldwin AL. *Endothelial actin cytoskeleton in rat mesentery microvasculature. Am J Physiol* 1994; 266:H1896–909.
  11. McCue S, Dajnowiec D, Xu F, Zhang M, Jackson MR, Langille BL. *Shear stress regulates forward and reverse planar cell polarity of vascular endothelium in vivo and in vitro. Circ Res* 2006;98:939–46.
  12. Ueki Y, Uda Y, Sakamoto N, Sato M. *Measurements of strain on single stress fibers in living endothelial cells induced by fluid shear stress. Biochem Biophys Res Commun* 2010;395:441–6.
  13. Schnittler HJ, Schneider SW, Raifer H, Luo F, Dieterich P, Just I et al. *Role of actin filaments in endothelial cell-cell adhesion and membrane stability*

*under fluid shear stress.* Pflugers Arch 2001; 442:675–87.

14. Loufrani L, Henrion D. *Role of the cytoskeleton in flow (shear stress)-induced dilation and remodeling in resistance arteries.* Med Biol Eng Compu 2008; 46:451–60.
15. Girard PR, Nerem RM. *Shear stress modulates endothelial cell morphology and F-actin organization through the regulation of focal adhesion-associated proteins.* J Cell Physiol 1995; 163: 179–93.
16. Reneman RS, Hoeks AP. *Wall shear stress as measured in vivo: consequences for the design of the arterial system.* Med Biol Eng Compu 2008;46:499–507.
17. Thurston G, Baldwin AL, Wilson LM. *Changes in endothelial actin cytoskeleton at leakage sites in the rat mesenteric microvasculature.* Am J Physiol 1995; 268:H316–29.
18. Nag S, Robertson DM, Dinsdale HB. *Intracerebral arteriolar permeability to lanthanum.* Am J Pathol 1982; 107:336–41.
19. Rhodin JA. *The ultrastructure of mammalian arterioles and precapillary sphincters.* J Ultrastruct Res 1967; 18:181–223.
20. Lindblom A, Paulsson M. *Basement membranes.* In: Comper WD (ed.). Extracellular Matrix. Harwood Academic Publisher GmbH, Amsterdam, 1996; 132–74.
21. Das A, Frank RN, Zhang NL, Turczyn TJ. *Ultrastructural localization of extracellular matrix components in human retinal vessels and Bruch's*



- membrane*. Arch Ophthalmol 1990; 108:421–9.
22. Stratman AN, Malotte KM, Mahan RD, Davis MJ, Davis GE. *Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation*. Blood 2009; 114:5091–101.
  23. Wight TN. *Arterial wall*. In: Comper WD (ed.). *Extracellular Matrix*. Harwood Academic Publishers GmbH, Amsterdam, 1996; 175–202.
  24. Arribas SM, Briones AM, Bellingham C, Gonzalez MC, Salaices M, Liu K et al. *Heightened aberrant deposition of hard-wearing elastin in conduit arteries of prehypertensive SHR is associated with increased stiffness and inward remodeling*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2008; 295:H2299–307.
  25. Sandow SL, Gzik DJ, Lee RM. *Arterial internal elastic lamina holes: relationship to function?* J Anat 2009; 214:258–66.
  26. Wong LC, Langille BL. *Developmental remodeling of the internal elastic lamina of rabbit arteries: effect of blood flow*. Circ Res 1996; 78:799–805.
  27. Miller BG, Gattone VH 2<sup>nd</sup>, Overhage JM, Bohlen HG, Evan AP. *Morphological evaluation of vascular smooth muscle cell: length and width from a single scanning electron micrograph of microvessels*. Anat Rec 1986; 216:95–103.
  28. Evan AP, Connors BA. *Morphometric analysis of vascular smooth muscle cells by scanning electron microscopy*. Int Rev Exp Pathol 1996; 36:31–52.
  29. Martinez-Lemus LA, Hill MA, Bolz SS, Pohl U, Meininger GA. *Acute*

*mechanoadaptation of vascular smooth muscle cells in response to continuous arteriolar vasoconstriction: implications for functional remodeling.* FASEB J 2004; 18:708–10.

30. Krizmanich WJ, Lee RM. *Correlation of vascular smooth muscle cell morphology observed by scanning electron microscopy with transmission electron microscopy.* Exp Mol Pathol 1997; 64:157–72.
31. Sosa-Melgarejo JA, Berry CL, Robinson NA. *Effects of hypertension on the intercellular contacts between smooth muscle cells in the rat thoracic aorta.* J Hypertens 1991;9:475–80.
32. Waitkus-Edwards KR, Martinez-Lemus LA, Wu X, Trzeciakowski JP, Davis MJ, Davis GE et al. *Alpha(4)beta(1) integrin activation of L-type calcium channels in vascular smooth muscle causes arteriole vasoconstriction.* Circ Res 2002; 90:473–80.
33. O’Connell MK, Murthy S, Phan S, Xu C, Buchanan J, Spilker R et al. *The three-dimensional micro- and nanostructure of the aortic medial lamellar unit measured using 3D confocal and electron microscopy imaging.* Matrix Biol 2008; 27:171–81.
34. Sangiorgi S, Manelli A, Dell’Orbo C, Congiu T. *A new method for the joint visualization of vascular structures and connective tissues: corrosion casting and 1 N NaOH maceration.* Microsc Res Tech 2006; 69:919–23.
35. Higuchi K, Hashizume H, Aizawa Y, Ushiki T. *Scanning electron microscopic*

- studies of the vascular smooth muscle cells and pericytes in the rat heart.*  
Arch Histol Cytol 2000;63: 115–26.
36. Haurani MJ, Pagano PJ. *Adventitial fibroblast reactive oxygen species as autocrine and paracrine mediators of remodeling: bellwether for vascular disease?* Cardiovasc Res 2007; 75:679–89.
  37. Forte A, Della Corte A, De Feo M, Cerasuolo F, Cipollaro M. *Role of myofibroblasts in vascular remodelling: focus on restenosis and aneurysm.* Cardiovasc Res 2010;88:395–405.
  38. Martinez-lenus LA. *The dynamic structure of arterioles.* Basic Clin Pharmacol Toxicol 2012; 110(1):5-11.
  39. Slaaf, DW, Tangelder, GJ, Teirlinck, HC, Reneman, RS. *Arteriolar vasomotion and arterial pressure reduction in rabbit tenuissimus muscle.* Microvasc Res 1987; 33, 71–80.
  40. Meyer JU, Borgström P, Lindbom L, Intaglietta M. *Vasomotion patterns in skeletal muscle arterioles during changes in arterial pressure.* Microvasc Res 1988; 35, 193–203.
  41. Bouskela E, Grampp W. *Spontaneous vasomotion in hamster cheek pouch arterioles in varying experimental conditions.* Am J Physiol 1992; 262, H478–H485.
  42. Bouskela E, Cyrino FZ, Wiernsperger N. *Effects of insulin and the combination of insulin plus metformin (glucophage) on microvascular*

- reactivity in control and diabetic hamsters. Angiology 1997; 48, 503–514.*
43. Verbeuren TJ, Vallez MO, Lavielle G, Bouskela E. *Activation of thromboxane receptors and the induction of vasomotion in the hamster cheek pouch microcirculation. Br J Pharmacol 1997; 122, 859–866.*
  44. Schmidt JA. *Periodic Hemodynamics in Health and Disease.* R.G. Landes Company, Georgetown. 1996.
  45. Jones TW. *Discovery that the veins of the bat's wing are endowed with rhythmical contractility and that onward flow of blood is accelerated by each contraction. Philos Trans R Soc Lond 1852; 142, 131–136.*
  46. Lindbom L, Tuma RF, Arfors KE. *Blood flow in rabbit tenuissimus muscle: influence of preparative procedures for intravital microscopy observations. Acta Physiol Scand 1982; 114: 121-27.*
  47. Colantuoni A, Bertuglia S, Intaglietta M. *Quantitation of rhythmic diameter changes in arterial microcirculation. Am J Physiol 1984; 246: H508-17.*
  48. Fagrell B, Intaglietta M, Ostergren J. *Relative hematocrit in human skin capillaries and its relationship to capillary flow velocity. Microvasc Res 1980; 20: 327-35.*
  49. Salerud GE, Tenland T, Nilsson GE, Oberg AP. *Rhythmical variations in human skin microcirculation. Int J Microcirc Clin Exp 1983; 2: 91-102.*
  50. Kaufman AG, Intaglietta M. *Automated diameter measurement of vasomotion by cross-correlation. Int J Microcirc Clin Exp 1985; 4, 45–53.*

51. Mahler F, Muheim MH, Intaglietta M, Bollinger A, Anliker M. *Blood pressure fluctuations in human nailfold capillaries*. Am J Physiol 1979; 236, H888–H893.
52. Bollinger A, Hoffmann U, Franzeck UK. *Evaluation of flux motion in man by the laser-Doppler technique*. Blood Vessels 1991; 28(Suppl. 1), 21–26.
53. Tsai AG, Intaglietta M. *Evidence of flowmotion induced changes in local tissue oxygenation*. Int J Microcirc Clin Exp 1993; 12, 75–88.
54. Collin O, Zupp JL, Setchell BP. *Testicular vasomotion in different mammals*. Asian J Androl 2000; 2, 297–300.
55. Westermaier T, Jauss A, Eriskat J, Kunze E, Roosen K. *Acute vasoconstriction: decrease and recovery of cerebral blood flow after various intensities of experimental subarachnoid hemorrhage in rats*. J Neurosurg 2009; 110, 996–1002.
56. Ances BM, Greenberg JH, Detre JA. *Interaction between nitric oxide synthase inhibitor induced oscillations and the activation flow coupling response*. Brain Res 2010; 1309,19–28.
57. Welsh M, Sharpe RM, Moffat L, Atanassova N, Saunders PT, Kilter S, Bergh, A, Smith LB. *Androgen action via testicular arteriole smooth muscle cells is important for Leydig cell function, vasomotion and testicular fluid dynamics*. PLoS ONE 2010; 5, e13632.
58. Intaglietta M. *Vasomotion and flowmotion: physiological mechanisms and*

- clinical evidence*. Vasc Med Review 1990; 1:101-112.
59. Colantuoni A, Bertuglia S, Intaglietta M. *Variations of rhythmical diameter changes at the arterial microvascular bifurcations*. Pflugers Arch 1985; 403: 289-95.
  60. Peng H, Matchkov V, Ivarsen A, Aalkjaer C, Nilsson H. *Hypothesis for the initiation of vasomotion*. Circ Res 2001; 88(8):810-5.
  61. Aalkjær C, Boedtkjer D and Matchkov V. *Vasomotion – what is currently thought?* Acta Physiol 2011; 202, 253–269.
  62. Kassab G S, Rider C A, Tang N J, Fung Y. *Morphometry of pig coronary arterial trees*. Am J Physiol 1993; 256: H350-H365.
  63. Lapi D, Marchiafava PL, Colantuoni A. *Geometric Characteristics of arterial network of rat pial microcirculation*. J Vasc Res 2008; 45: 69–77.
  64. Colantuoni A, Lapi D, Marchiafava PL, Ursino M. *Morphometry of skeletal muscle microcirculation and regulation of capillary perfusion*. 2<sup>nd</sup> Meeting of the European Study Group of Cardiovascular Oscillation, Certosa di Pontignano (Siena), Italy, April 19-22, 2002, Abstract book, page 17.
  65. Matchkov VV, Aalkjaer C, Nilsson H. *A cyclic GMP-dependent calcium-activated chloride current in smooth muscle cells from rat mesenteric resistance arteries*. J Gen Physiol 2004; 123, 121–134.

66. Matchkov VV, Aalkjaer C, Nilsson H. *Distribution of cGMP-dependent and cGMP-independent  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^-$  conductances in smooth muscle cells from different vascular beds and colon.* Pflügers Arch 2005; 451, 371–379.
67. Matchkov VV, Larsen P, Bouzinova EV, Rojek A, Boedtkjer DM, Golubinskaya V, Pedersen FS, Aalkjaer C, Nilsson H. *Bestrophin-3 (vitelliform macular dystrophy 2-like 3 protein) is essential for the cGMP-dependent calcium-activated chloride conductance in vascular smooth muscle cells.* Circ Res 2008; 103, 864–872.
68. Piper AS, Large WA. *Direct effect of  $Ca^{2+}$ /calmodulin on cGMP-activated  $Ca^{2+}$ -dependent  $Cl^-$  channels in rat mesenteric artery myocytes.* J Physiol 2004; 559, 449–457.
69. Piper AS, Large WA. *Single cGMP-activated  $Ca^{2+}$ -dependent  $Cl^-$  channels in rat mesenteric artery smooth muscle cells.* J Physiol 2004; 555, 397–408.
70. Boedtkjer DM, Matchkov VV, Boedtkjer E, Nilsson H, Aalkjaer C. *Vasomotion has chloride-dependency in rat mesenteric small arteries.* Pflügers Arch 2008; 457, 389–404.
71. Soderstrom T, Stefanovska A, Veber M, Svensson H. *Involvement of sympathetic nerve activity in skin blood flow oscillations in humans.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 284(5):H1638-46.
72. Am J. *Involvement of sympathetic nerve activity in skin blood flow oscillations in humans.* Physiol Heart Circ Physiol 2003; 284(5):H1638-46.

73. Muck-Weymann ME, Albrecht HP, Hager A, Hiller D, Hornstein OP, Bauer RD. *Respiratory-dependent laser doppler flux motion in different skin areas and its meaning to autonomic nervous control of the vessels of the skin.* Microvascular Research 1996; 52: 69–78.
74. Stefanovska A, Kroelj P. *Correlation integral and frequency analysis of cardiovascular functions.* Open Systems and Information Dynamics archive 1997; 4.
75. Kvandal P, Landsverk SA, Bernjak A, Stefanovska A, Kvernmo HD, Kirkebøen KA. *Low-frequency oscillations of the laser doppler perfusion signal in human skin.* Microvascular Research 2006; 72: 120–127.
76. Shepherd AP. *History of laser-Doppler blood flowmetry.* In: Shepherd AP, Oberg PA (eds) Laser-Doppler blood flowmetry Kluwer, Boston 1990.
77. Riva C, Ross B, Benedek GB. *Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries.* Invest Ophthalmol 1972; 11:936–944
78. Stern MD. *In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering.* Nature 1975; 254:56–58
79. Bonner RF, Nossal R. *Model for laser Doppler measurements of blood flow in tissue.* Appl Opt 1981; 20:2097–2107
80. Duteil L, Bernengo J, Schalla W. *A double wavelength laser Doppler system to investigate skin microcirculation.* IEEE Trans Biomed Eng BME 1985; 32:439–447



81. Gush RJ, King TA, Jayson MI. *Aspects of laser light scattering from skin tissue with application to laser Doppler blood flow measurement*. Phys Med Biol 1984; 29:1463–1476
82. Holloway GA, Watkins DW. *Laser Doppler measurement of cutaneous blood flow*. J Invest Dermatol 1977; 69:306–309
83. Johansson K, Jakobsson A, Lindahl K, Lindhagen J, Lundgren O, Nilsson GE. *Influence of fibre diameter and probe geometry on the measuring depth of laser Doppler flowmetry in the gastrointestinal application*. Int J Microcirc Clin Exp 1991; 10:219–229
84. Humeau A, Steenbergen W, Nilsson H, Strömberg T. *Laser Doppler perfusion monitoring and imaging: novel approaches*. Med Bio Eng Comput 2007; 45:421–435
85. Sarnik S, Hofirek I, Sochor O. *Laser doppler fluxmetry*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2007; 151(1):143–146.
86. Choi CM, Bennett RG. *Laser doppler to determine cutaneous blood flow*. Dermatol Surg 2003; 29(3):272-80.
87. Stefanovska A, Bracic M, Kvernmo HD. *Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique*. IEEE Trans Biomed Eng 1999; 46:1230–1239.
88. Rossi M, Bertuglia S, Varanini M, Giusti A, Santoro G, Carpi A. *Generalized wavelet analysis of cutaneous flowmotion during post-occlusive reactive*

- hyperaemia in patients with peripheral arterial obstructive disease. Biomed Pharmacother* 2005; 59:233–239.
89. Rossi M, Maurizio S, Carpi A. *Skin blood flowmotion response to insulin iontophoresis in normal subjects. Microvasc Res* 2005; 70:17–22.
  90. Rossi M, Santoro G, Ricco R, Pentimone F, Carpi A. *Effect of chronic aerobic exercise on cutaneous microcirculatory flow response to insulin iontophoresis and to ischemia in elderly males. Int J Sports Med* 2005; 26: 558–562.
  91. Stern MP. *Diabetes and cardiovascular disease. The “common soil” hypothesis. Diabetes* 1995; 44: 369-74.
  92. Pi-Sunyer FX. *The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. Obes Res* 2002; 10 (Suppl 2): 97S-104S.
  93. Kahn BB, Flier JS. *Obesity and insulin resistance. J Clin Invest* 2000; 106: 473-81
  94. Kershaw EE, Flier JS. *Adipose tissue as an endocrine organ. J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2548-56.
  95. Clark MG. *Impaired microvascular perfusion: a consequence of vascular dysfunction and a potential cause of insulin resistance in muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295(4):E732-50
  96. Jonk AM, Houben AJ, de Jongh RT, Serne' EH, Schaper NC, Stehouwer CD. *Microvascular dysfunction in obesity: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension.*

Physiology 2007; 22: 252– 260.

97. Levy BI, Schiffrin EL, Mourad JJ, Agostini D, Vicaud E, Safar ME, Struijker-Boudier HA. *Impaired tissue perfusion: a pathology common to hypertension, obesity, and diabetes mellitus*. Circulation 2008; 118: 968–976.
98. Serne´ EH, Gans RO, ter Maaten JC, Tangelder GJ, Donker AJ, Stehouwer CD. *Impaired skin capillary recruitment in essential hypertension is caused by both functional and structural capillary rarefaction*. Hypertension 2001; 38: 238–242.
99. Wiernsperger N, Nivoit P, De Aguiar LG, Bouskela E. *Microcirculation and the metabolic syndrome*. Microcirculation 2007; 14: 403–438.
100. de Jongh RT, Ijzerman RG, Serne´ EH, Voordouw JJ, Yudkin JS, de Waal HA, Stehouwer CD, van Weissenbruch MM. *Visceral and truncal subcutaneous adipose tissue are associated with impaired capillary recruitment in healthy individuals*. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91: 5100– 5106.
101. de Jongh RT, Serne EH, Ijzerman RG, de Vries G, Stehouwer CD. *Impaired microvascular function in obesity: implications for obesity-associated microangiopathy, hypertension, and insulin resistance*. Circulation 2004; 109: 2529–2535.
102. Ketel IJ, Stehouwer CD, Serne´ EH, Korsen TJ, Hompes PG, Smulders YM, de Jongh RT, Homburg R, Lambalk CB. *Obese but not normal-weight women with polycystic ovary syndrome are characterized by metabolic and*

- microvascular insulin resistance*. J Clin Endocrinol Metab 2008; 93: 3365–3372.
103. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. *Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance*. J Clin Invest 1996; 97: 2601–2610.
  104. Laine H, Knuuti MJ, Ruotsalainen U, Utriainen T, Oikonen V, Raitakari M, Luotolahti M, Kirvelä O, Vicini P, Cobelli C, Nuutila P, Yki-Järvinen H. *Preserved relative dispersion but blunted stimulation of mean flow, absolute dispersion, and blood volume by insulin in skeletal muscle of patients with essential hypertension*. Circulation 1998; 97: 2146–2153.
  105. Serne´ EH, Gans RO, ter Maaten JC, ter Wee PM, Donker AJ, Stehouwer CD. *Capillary recruitment is impaired in essential hypertension and relates to insulin’s metabolic and vascular actions*. Cardiovasc Res 2001; 49: 161–168.
  106. Serne´ EH, Ijzerman RG, Gans RO, Nijveldt R, De Vries G, Evertz R, Donker AJ, Stehouwer CD. *Direct evidence for insulin induced capillary recruitment in skin of healthy subjects during physiological hyperinsulinemia*. Diabetes. 2002; 51(5):1515-22.
  107. Serne´ EH, Stehouwer CD, ter Maaten JC, ter Wee PM, Rauwerda JA, Donker AJ, Gans RO. *Microvascular function relates to insulin sensitivity and blood pressure in normal subjects*. Circulation 1999; 99: 896– 902.

108. Schelbert HR. *Coronary circulatory function abnormalities in insulin resistance. Insights from positron emission tomography.* J Am Coll Cardiol 2009; 53: S3–S8.
109. Wong TY, Duncan BB, Golden SH, Klein R, Couper DJ, Klein BE, Hubbard LD, Sharrett AR, Schmidt MI. *Associations between the metabolic syndrome and retinal microvascular signs: the Atherosclerosis Risk in Communities study.* Invest Ophthalmol Vis Sci 2004; 45: 2949–2954.
110. Ijzerman RG, de Jongh RT, Beijk MA, van Weissenbruch MM, Delemarre-van de Waal HA, Serne EH, Stehouwer CD. *Individuals at increased coronary heart disease risk are characterized by an impaired microvascular function in skin.* Eur J Clin Invest 2003; 33: 536–542.
111. Debbabi H, Uzan L, Mourad JJ, Safar M, Levy BI, Tibiriça E. *Increased skin capillary density in treated essential hypertensive patients.* Am J Hypertens 2006; 19: 477–483.
112. Wang L, Jerosch-Herold M, Jacobs DR Jr, Shahar E, Folsom AR. *Coronary risk factors and myocardial perfusion in asymptomatic adults: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA).* J Am Coll Cardiol 2006; 47: 565–572.
113. Barrett EJ, Eggleston EM, Inyard AC, Wang H, Li G, Chai W, Liu Z. *The vascular actions of insulin control its delivery to muscle and regulate the rate-limiting step in skeletal muscle insulin action.* Diabetologia 2009; 52:

752–764.

114. Clark MG. *Impaired microvascular perfusion: a consequence of vascular dysfunction and a potential cause of insulin resistance in muscle.* Am J Physiol Endocrinol Metab 2008; 295: E732–E750.
115. Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. *Cardiovascular actions of insulin.* Endocr Rev 2007; 28: 463–491.
116. Serne' EH, de Jongh RT, Eringa EC, Ijzerman RG, Stehouwer CD. *Microvascular dysfunction: a potential pathophysiological role in the metabolic syndrome.* Hypertension 2007; 50: 204–211.
117. Kubota T, Kubota N, Kumagai H, Yamaguchi S, Kozono H, Takahashi T, Inoue M, Itoh S, Takamoto I, Sasako T, Kumagai K, Kawai T, Hashimoto S, Kobayashi T, Sato M, Tokuyama K, Nishimura S, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Yamazaki T, Ezaki O, Kawamura K, Masuda H, Moroi M, Sugi K, Oike Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R, Kamata K, Inoue K, Kodama T, Ueki K, Kadowaki T. *Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle.* Cell Metab 2011; 13: 294–307.
118. Li R, Zhang H, Wang W, Wang X, Huang Y, Huang C, Gao F. *Vascular insulin resistance in prehypertensive rats: role of PI3-kinase/Akt/eNOS signaling.* Eur J Pharmacol 2010; 62: 140–147.
119. Eringa EC, Stehouwer CD, Roos MH, Westerhof N, Sipkema P. *Selective*

- resistance to vasoactive effects of insulin in muscle resistance arteries of obese Zucker (fa/fa) rats. Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E1134–E1139,.
120. Jiang ZY, Lin YW, Clemont A, Feener EP, Hein KD, Igarashi M, Yamauchi T, White MF, King GL. *Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. J Clin Invest* 1999; 104: 447–457.
  121. Cardillo C, Nambi SS, Kilcoyne CM. *Insulin stimulates both endothelin and nitric oxide activity in the human forearm. Circulation* 1999; 100: 820–825.
  122. Gudbjornsdottir S, Elam M, Sellgren J, Anderson EA. *Insulin increases forearm vascular resistance in obese, insulin-resistant hypertensives. J Hypertens* 1996; 14: 91–97.
  123. Cardillo C, Campia U, Iantorno M, Panza JA. *Enhanced vascular activity of endogenous endothelin-1 in obese hypertensive patients. Hypertension* 2004; 43: 36–40.
  124. de Jongh RT, Clark AD, IJzerman RG, Serne EH, de Vries G, Stehouwer CD. *Physiological hyperinsulinaemia increases intramuscular microvascular reactive hyperaemia and vasomotion in healthy volunteers. Diabetologia* 2004; 47: 978–986.
  125. Rossi M, Maurizio S, Carpi A. *Skin blood flowmotion response to insulin iontophoresis in normal subjects. Microvasc Res* 2005; 70: 17–22.

126. Newman JMB, Ross RM, Richards SM, Clark MG, Rattigan S. *Decreased microvascular vasomotion and myogenic response in rat skeletal muscle in association with acute insulin resistance.* J Physiol 2009; 587: 2579–2588.
127. Graier WF, Posch K, Fleischhacker E, Wascher TC, Kostner GM. *Increased superoxide anion formation in endothelial cells during hyperglycemia: an adaptive response or initial step of vascular dysfunction?* Diabetes Res Clin Pract 1999; 45, 153-160.
128. Pieper GM, Meier DA, Hager SR. *Endothelial dysfunction in a model of hyperglycemia and hyperinsulinemia.* Am J Physiol 1995; 269, H845-H850.
129. Urso C, Caimi G. *Stress ossidativo e disfunzione endoteliale.* Minerva Medica 2011; 102(1):59-77
130. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus.* Diabetes Care 2003; 26 Suppl 1:S5-20.
131. Cameron NE, Eaton SE, Cotter MA, Tesfaye S. *Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy.* Diabetologia. 2001; 44(11):1973-88.
132. Shin JY, Lee HR, Lee DC. *Increased arterial stiffness in healthy subjects with high-normal glucose levels and in subjects with pre-diabetes.* Cardiovasc Diabetol 2011; 10:30.
133. Short KR, Blackett PR, Gardner AW, Copeland KC. *Vascular health in*



*children and adolescents: effects of obesity and diabetes.* Vasc Health Risk Manag 2009; 5:973-90.

134. Schalkwijk CG, Stehouwer CD. *Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction.* Clin Sci (Lond) 2005; 109(2):143-59.
135. *Misure antropometriche.* In: Gabriele Riccardi, Delia Pacioni, Angela A. Rivellese. Manuale di nutrizione applicata. Edizioni Sorbona.
136. *Valutazione dello stato nutrizionale.* In: Gabriele Riccardi, Delia Pacioni, Angela A. Rivellese. Manuale di nutrizione applicata. Edizioni Sorbona.
137. Roustit M, Cracowski JL. *Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods.* Microcirculation 2012; 19(1):47-64.